



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio y caracterización funcional de la interacción de
la E3 ligasa CRL4^{Cdt2} con el complejo regulador de la
cromatina G9a GLP

*Tesis presentada para optar al Título de Doctor
de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas.*

Lic. Juliana Haydeé Enrique Steinberg

Director de tesis: Dr. Mario Rossi

Consejero de Estudio: Dr. Eduardo Arzt

***Lugar de trabajo: Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos
Aires – CONICET – Instituto Partner de la Sociedad Max Planck***

Buenos Aires, 2018

Agradecimientos

Gracias Mario por la posibilidad y el apoyo constante.

Gracias Fabi por tantas horas compartidas.

Gracias a los Mushis, a Ezequielito y a todos los integrantes del laboratorio que me han ayudado y soportado todos estos años.

Gracias a las personas que me cruce hace 10 años en Posadas y todavía hoy me acompañan.

Gracias a lo más lindo que me toco en esta vida, las personas a las que les dedico este trabajo...

...Osvaldo, Diana, Ángeles y Nicolás.

Estudio y caracterización funcional de la interacción de la E3 ligasa CRL4^{Cdt2} con el complejo regulador de la cromatina G9a GLP

La formación y progresión de tumores está regulada en última instancia por la abundancia y la actividad de factores proteicos oncogénicos o supresores tumorales. En línea con esto se ha demostrado que la proteólisis irregular de factores proteicos implicados en la regulación del ciclo celular, la transcripción génica y la apoptosis contribuye a la transformación oncogénica y a la carcinogénesis. En células eucariotas, la homeostasis proteica está finamente regulada por el Sistema Ubiquitina/Proteosoma (*Ubiquitin Proteasome System*, UPS), que consiste en una compleja red enzimática encargada de transferir moléculas de ubiquitina a un sustrato y de este modo promover su degradación a través del proteosoma o modular su ubicación espacio temporal en una vía celular determinada. Por lo tanto, el estudio a nivel molecular de la cascada de ubiquitinación, junto con el desarrollo de compuestos que modulan componentes específicos del UPS, podrían facilitar el desarrollo y mejoramiento de nuevos y mejores tratamientos de distintas patologías. En este sentido, las ligasas de ubiquitina (o E3s) son excelentes candidatas debido a que estas enzimas son los efectores finales de la cascada de ubiquitinación y dictan la especificidad de la maquinaria del UPS. La E3 ligasa CRL4^{Cdt2} desempeña un rol fundamental en la regulación de la replicación y reparación del ADN, en condiciones normales como así también en respuesta al daño al ADN. Diferentes evidencias indican que las alteraciones en los niveles de CRL4^{Cdt2} pueden contribuir a la aparición y progresión del cáncer. Todos los sustratos conocidos de CRL4^{Cdt2} tienen un dominio PIP (*PCNA Interacting Protein*) que interactúa con PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) asociado a la cromatina, y es precisamente la unión de los sustratos a PCNA lo que asegura su degradación. Por este motivo, con el objeto de identificar nuevos sustratos de CRL4^{Cdt2} que permitan ahondar en el mecanismo molecular de acción de este complejo, se realizó una purificación por afinidad en tándem de Cdt2 sobre-expresado y posterior espectrometría de masa en tándem en la fracción cromatínica. A partir de estos resultados se escogieron distintos candidatos teniendo en cuenta la frecuencia de aparición de los mismos en las distintas purificaciones y se logró validar la interacción de Cdt2 sobre-expresado en la cromatina con G9a y GLP. Estas proteínas son metiltransferasas de histonas que catalizan la mono y la

dimetilación de la Histona 3 en la Lisina 9, esta marca epigenética se encuentra relacionada con silenciamiento transcripcional y es indispensable para la constitución de la heterocromatina. Debido a que G9a tiene la capacidad de metilar también proteínas no histónicas realizamos un análisis de modificaciones postraduccionales de Cdt2 en una línea control y en líneas *knockout* que no expresan G9a y GLP (generadas por el sistema CRISPR/Cas9), donde no se encontraron péptidos de Cdt2 metilados diferencialmente en la línea control, aunque se requieren estudios adicionales y más detallados para obtener una respuesta más sólida y definitiva.

Logramos identificar y validar la interacción de Cdt2 con otras dos proteínas que interactúan con el complejo G9a/GLP y median su interacción con el ADN. Utilizando ARN de interferencia de Cdt2 comprobamos que la vida media de las proteínas que forman parte de este complejo no se encuentra regulada por esta E3 ligasa, así como tampoco la localización subcelular. Debido a que el silenciamiento de Cdt2 ocasiona re-replicación e inestabilidad genómica, desarrollamos también una línea celular que no expresa Cdt2 endógeno y expresa una construcción Cdt2-Flag que es inducible con doxiciclina. Los experimentos de vida media en diferentes clones de esta línea celular confirmaron los resultados obtenidos con ARN de interferencia.

Por último, es importante destacar que CRL4^{Cdt2} también cumple un rol importante en la regulación de la respuesta celular a estrés genotóxico. Asimismo, recientemente se ha reportado que G9a interviene en la regulación de la respuesta al daño al ADN. Por lo tanto, estamos actualmente estudiando si la interacción funcional entre CRL4^{Cdt2} y G9a/GLP posee una función importante en la modulación de la respuesta celular a distintos daños. En este sentido hemos obtenidos resultados preliminares muy alentadores. Esperamos que en estudios posteriores podamos ahondar en la caracterización molecular del eje CRL4^{Cdt2}/G9a y la función que cumple en el control de la integridad genómica.

Palabras claves: Sistema Ubiquitina Proteosoma, E3 ligasas, CRL4^{Cdt2}, ubiquitina, G9a/GLP.

Study and functional characterization of the interaction of the E3 ligase CRL4^{Cdt2} with the chromatin remodeling complex G9a/GLP

The formation and progression of tumors is ultimately regulated by the abundance and activity of oncogenic protein factors or tumor suppressors. Accordingly, aberrant proteolysis of substrates involved in the regulation of cell cycle, gene transcription, and apoptosis has been shown to contribute to carcinogenesis. In eukaryotic cells, protein homeostasis is tightly regulated by the Ubiquitin Proteasome System (UPS), which consists of a complex enzymatic network responsible for transferring molecules of ubiquitin to a substrate and thereby promote its degradation through proteasome or modulate its spatio-temporal localization in a specific cell pathway. Therefore, the molecular study of ubiquitination cascades, together with the development of compounds that modulate specific components of the UPS, could facilitate the development and improvement of new and better strategies for the treatment of different pathologies. Accordingly, the ubiquitin ligase protein group (or E3s) represents an excellent candidate, because these enzymes are the final effectors of the ubiquitination cascade and thus dictate the specificity of UPS machinery. E3 ligase CRL4^{Cdt2} plays a key role in the regulation of DNA replication and repair, in normal conditions as well as in response to DNA damage. Different lines of evidence indicate that alterations in the levels of CRL4^{Cdt2} may contribute to the onset and progression of cancer. All known substrates of CRL4^{Cdt2} have a PIP domain (PCNA Interacting protein) that interacts with PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) associated with chromatin, and it is precisely the binding of the substrates to PCNA which ensures its timely degradation. Hence, with the aim to gain further insight into the molecular mechanisms of action of CRL4^{Cdt2}, we performed a tandem affinity purification of overexpressed Cdt2 and subsequent tandem mass spectrometry using only the chromatin cellular fraction. Using this strategy, among the most abundant putative Cdt2 protein interacting factors, we identified and validated the interaction between overexpressed Cdt2 and G9a/GLP. These two proteins are histone methyltransferases that catalyze the mono and dimethylation of Histone 3 in Lysine 9, which plays an important role in the transcriptional silencing process and is necessary for heterochromatin domains formation. G9a has also the ability to methylate non-histone proteins, and for this reason we performed post-translational modifications analysis of Cdt2 on knockout cell lines that do not express G9a and GLP, that were generated by the

CRISPR/Cas9 system. So far, we do not find significant differences between normal and knockout cell lines although further and more detailed studies are required to obtain a more robust and definitive answer.

We were able to identify and validate the interaction of Cdt2 with two other proteins that interact with the G9a/GLP and mediate their interaction with the DNA. Using interference RNA against Cdt2, we found that CRL4^{Cdt2} does not regulate the half-life of the G9a/GLP protein complex, neither its subcellular localization. Because Cdt2 silencing causes re-replication and genomic instability, we also developed a cell line that does not express endogenous Cdt2 but harbors a doxycycline inducible Cdt2-Flag construct that allowed us to perform half-life experiments without affecting overall cellular homeostasis. Using different clones, we confirmed the results obtained with small interfering RNA.

Finally, as mentioned before, it is well established that CRL4^{Cdt2} plays an important role in the regulation of the genotoxic stress response. Accordingly, recent reports indicate that G9a also intervenes in the regulation of the response to DNA damage. Therefore, we are currently studying whether the functional interaction between CRL4^{Cdt2} and the G9a/GLP complex plays an important role in the modulation of the cellular response to different DNA damage agents. In this regard, we have obtained very encouraging preliminary results. Further studies are required to unveil the specific and intricate molecular mechanism of action of the CRL4^{Cdt2}/G9a axis and its role in the control of genomic stability.

Key words: Ubiquitin Proteasome System, E3 ligases, CRL4^{Cdt2}, ubiquitin, G9a / GLP.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	11
La ubiquitinación	12
UBLs (<i>Ubiquitin-Like Proteins</i>)	14
Las E3 ligasas	15
Las E3 ligasas HECT	15
Las E3 ligasas RBR.....	16
Las E3 ligasas <i>RING-Finger domain</i>	16
Las E3 ligasas Cullin-RING domain (CRLs)	17
APC/C	17
Las E3 ligasas U-box.....	17
La E3 ligasa CRL4Cdt2 cumple un rol clave en el control de la replicación del ADN y la proliferación celular	18
El licenciamiento de los orígenes de replicación.....	20
La E3 ligasa CRL4 ^{Cdt2} y su rol en la replicación y reparación del ADN	21
La E3 ligasa CRL4 ^{Cdt2} y su rol en la reorganización de la cromatina	22
La E3 ligasa CRL4 y su interacción con modificadores epigenéticos	23
Potencial terapéutico de las E3 ligasas en cáncer.....	24
CRL4 ^{Cdt2} es un potencial blanco terapéutico en el tratamiento del cáncer	25
G9a y GLP: los represores de la transcripción génica	25
G9a y cáncer	28
Reparación del daño al ADN	29
Recombinación no homóloga (NHEJ).....	29
Recombinación homóloga (HR)	29

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
Hipótesis.....	32
Objetivos	32
Objetivo general	32
Objetivos específicos	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
Vectores y Construcciones	34
Preparación de bacterias competentes.....	34
Transformación bacteriana y aislamiento de plásmidos.....	35
Preparación de plásmidos a pequeña escala (mini-preparaciones)	35
Análisis de plásmidos por enzimas de restricción	36
Preparación de plásmidos a gran escala (maxi/mega-preparaciones)	36
Líneas celulares	37
Transfecciones transitorias y transducción de líneas celulares	37
Transfección de DNA	37
Transfección de ARN de interferencia.....	38
Síntesis de partículas virales.....	38
Infección de líneas celulares y posterior selección	38
Purificación de Cdt2 sobre-expresado y espectrometría de masa en tándem	39
Western Blot	40
Preparación de los extractos celulares.....	40
Inmunoprecipitación de proteínas sobre-expresadas	41
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), electrotransferencia y revelado.....	42
Mutagénesis dirigida	43
TR-TUBE.....	45
Determinación de la vida media	46

Sincronización	46
Sincronización con <i>Nocodazole</i>	46
Doble bloqueo con Timidina.....	46
Tratamientos de agentes genotóxicos	47
Inmunofluorescencia.....	47
Generación de líneas <i>Knockout</i> por el sistema CRISPR/Cas9.....	47
Análisis de modificaciones post-traduccionales de Cdt2	48
Daño al ADN inducido por láser y “Live Imaging”	49
RESULTADOS	50
Purificación y selección de interactores de CRL4 ^{Cdt2}	51
Purificación de proteínas que interactúan con Cdt2.....	51
Identificación de los candidatos más prometedores a través de un enfoque multifactorial integrador	53
Validación de los interactores seleccionados	55
Cdt2 interactúa con G9a y GLP sólo en la fracción cromatínica	55
Identificación del <i>degron</i> de G9a	57
G9a interactúa con los dominios WD40 de Cdt2	65
Caracterización molecular de la interacción	67
Cdt2 también interactúa con ZNF644 y WIZ	67
Estudio de los efectos de CRL4 ^{Cdt2} en la vida media de los distintos componentes del complejo G9a/GLP/ZNF644 y WIZ	68
Generación de líneas celulares que expresan Cdt2 de manera inducible	70
Análisis de los niveles proteicos de G9a y GLP a través del ciclo celular	76
Estudio del efecto de CRL4 ^{Cdt2} en la poliubiquitinación de G9a, GLP, ZNF644 y WIZ	78
Generación de líneas celulares mediante la técnica de CRISPR/Cas9.....	82
Análisis de modificaciones post-traduccionales de Cdt2	85
G9a y su rol en la reparación del ADN.....	87

DISCUSIÓN	93
Conclusiones.....	94
Discusión	96
BIBLIOGRAFÍA.....	104
ANEXO	118
Lista de genes interactores de Cdt2 purificados por espectrometría de masa en tandem (MS/MS).....	119
<i>Primers</i> utilizados para realizar la mutagénesis en el vector de G9a.....	131
<i>Primers</i> que utilizados para secuenciar los plásmidos de G9a.....	133
<i>Primers</i> utilizados para realizar la mutagénesis en el vector de GLP	133
<i>Primers</i> utilizados para realizar mutagénesis en el vector de Cdt2	133
Secuencias guías para generar las líneas <i>Knockout</i> por CRISPR/Cas9.....	133

INTRODUCCIÓN

La ubiquitinación

La ubiquitinación es una modificación post-traducciona que media la unión de ubiquitina a un sustrato (1). Está ampliamente demostrado que la ubiquitinación regula un amplio rango de mecanismos biológicos, entre los que se encuentran la degradación de proteínas (2, 3), la endocitosis (4), la progresión del ciclo celular (5, 6), la reparación del ADN (7), la transcripción y la traducción (8-10), entre otros. La desregulación de cualquier componente de este complejo sistema está estrechamente relacionada con diversas enfermedades humanas, como el cáncer, la autoinmunidad, la neurodegeneración y las enfermedades infecciosas (11-13).

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos que adopta una conformación globular y se encuentra altamente conservada en los eucariotas (14). La ubiquitinación de proteínas necesita la acción conjunta de tres enzimas diferentes que actúan en modo secuencial. Una enzima E1 debe activar primero a la ubiquitina, mediante una reacción dependiente de ATP en donde se genera un intermediario tioéster (E1-S-Ub). En esta reacción, la E1 forma un enlace covalente entre el extremo C-terminal de la ubiquitina y un residuo de cisteína en su sitio activo. La ubiquitina pasa desde el sitio activo de la E1 al siguiente miembro de la cascada, la E2 o enzima de conjugación de ubiquitina. Finalmente, la E3 ligasa transfiere la ubiquitina activada desde la E2 a la lisina del sustrato proteico (15). En mamíferos, la cascada de ubiquitinación cuenta con dos enzimas E1 de activación (UBA1 y UBA6) (16-18) y aproximadamente 40 enzimas E2 de conjugación. Las enzimas E2 de conjugación le proporcionan la ubiquitina activada a las más de 600 E3 ligasas conocidas (19). Además, las células contienen isopeptidasas, denominadas deubiquitinasas (DUBs), que escinden la ubiquitina de los sustratos o modifican las cadenas de ubiquitina. El genoma humano codifica para cerca de 100 enzimas DUBs, que exhiben especificidad por diferentes topologías de cadenas de ubiquitina (20, 21) (**Figura 1**).

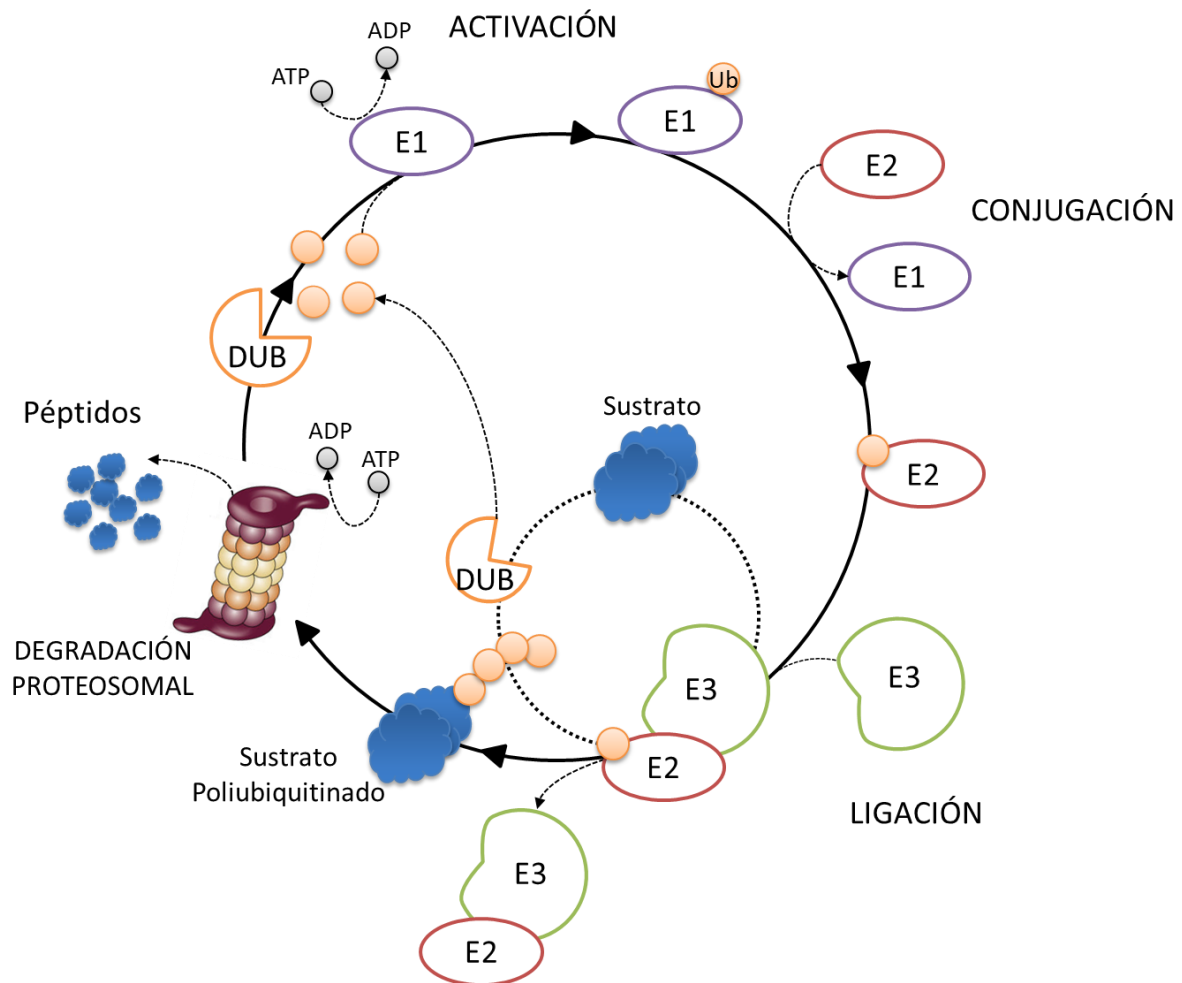


Figura 1. Cascada de ubiquitinación. La ubiquitina (Ub) es activada por la enzima E1 de activación en un paso dependiente de ATP. Se genera un intermediario tioéster E1-S-Ub. La ubiquitina es luego transferida a una enzima E2 de conjugación (E2-S-Ub) y finalmente al sustrato, a través de una E3 ligasa. Estas reacciones enzimáticas se repiten y los residuos de ubiquitina se unen secuencialmente generando una cadena de poliubiquitina. El sustrato poliubiquitinado es reconocido y degradado por el proteosoma 26S. Las enzimas deubiquitinasas (DUBs) escinden la ubiquitina de los sustratos y son las responsables de reciclar las moléculas de ubiquitina.

La ubiquitina contiene 7 residuos de lisina, que recubren toda la superficie de la proteína y apuntan a distintas direcciones, mediante los cuales distintas moléculas de ubiquitina pueden unirse para el ensamblado de cadenas de poliubiquitina (22). Los distintos tipos de unión entre los residuos de lisina de una ubiquitina con el C-terminal de la ubiquitina siguiente dan lugar a diferentes tipos de cadenas. Precisamente, la topología de la cadena de ubiquitina es la que determina el destino de los sustratos (**Figura 2**) (23). Mientras que las cadenas formadas mediante la unión consecutiva de ubiquitinas a través de la lisina 48 pueden desencadenar la degradación proteosomal del sustrato (2, 24), las proteínas que contienen cadenas unidas a través de la lisina 63 pueden modificar su destino en diferentes vías de señalización celular (25, 26). También existen otros tipos de enlaces de

ubiquitina, entre los que pueden mencionarse las mezclas heterogéneas de enlaces que dan lugar a cadenas heterotípicas (ramificadas), pero su significado biológico aún no es muy claro (27-29). La monoubiquitinación de proteínas, que implica la unión de una única molécula de ubiquitina en un único sitio o en varios lugares, puede estar involucrada tanto en la endocitosis como en la señalización celular (30, 31).

Por lo tanto, debido a la alta complejidad del sistema, la ubiquitinación de proteínas puede producir una gran diversidad de cambios funcionales.

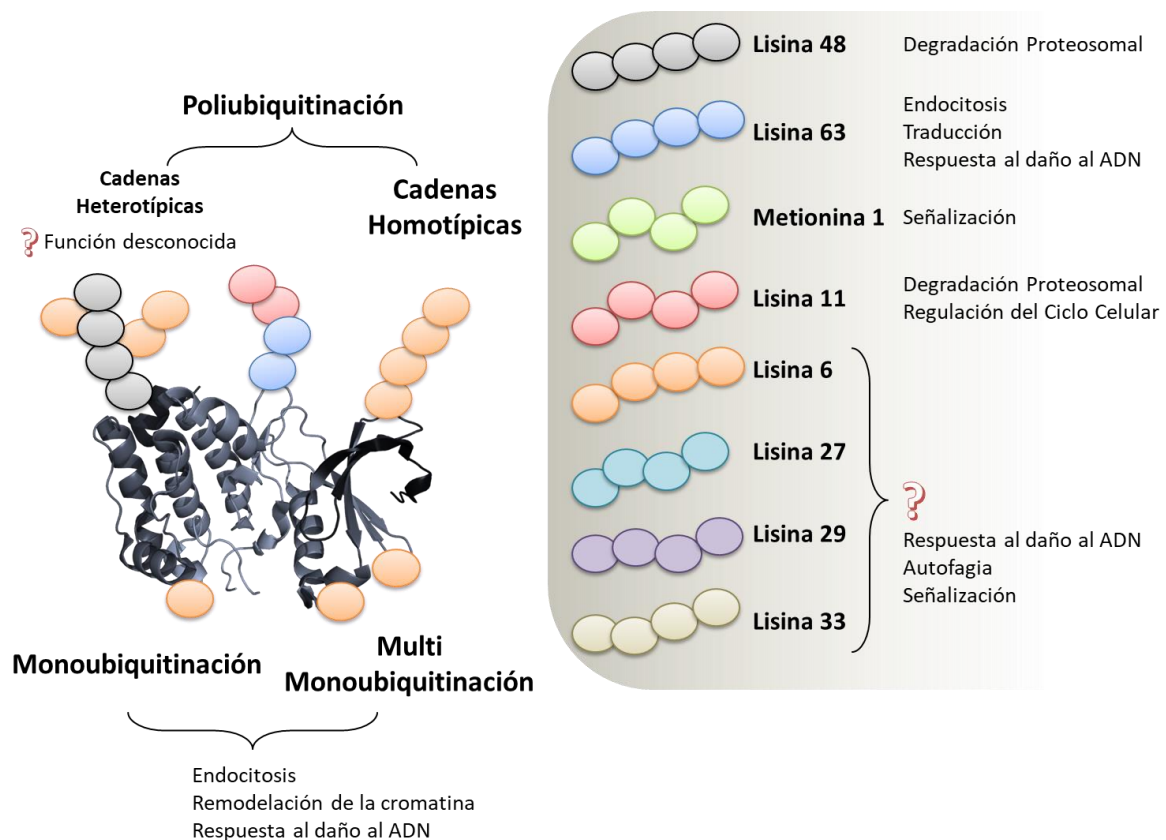


Figura 2. Topología de ubiquitinación. Existe una gran diversidad de formas en las que la ubiquitina puede unirse a los sustratos. La unión de una única molécula de ubiquitina en uno o en varios lugares se denomina, monoubiquitinación o multi-monoubiquitinación. La poliubiquitinación puede formar cadenas heterotípicas (están involucradas distintos tipos de uniones entre las moléculas de ubiquitinas) u homotípicas (tienen el mismo tipo de unión entre las ubiquitinas). La topología de la modificación determina el destino del sustrato.

UBLs (*Ubiquitin-Like Proteins*)

Además de la ubiquitina, se identificaron otras proteínas relacionadas en su secuencia, estructura o función, que se conocen como UBLs (por su nombre en inglés, *Ubiquitin-Like Proteins*). Existen 17 UBLs de nueve clases filogenéticamente distintas (NEDD8, SUMO, ISG15, FUB1, FAT10, Atg8, Atg12, Urm1, and UFM1) que pueden modificar

post-traduccionalmente distintas proteínas (32). Las UBLs se conjugan a sus sustratos de una manera similar a la ubiquitina, pero tienen consecuencias funcionales muy diferentes (33). La conjugación de distintas UBLs puede modificar la actividad o la localización subcelular de un sustrato, pero no puede promover su degradación (34).

Las E3 ligasas

Como se describió anteriormente, la organización de la cascada de ubiquitinación es jerárquica. Una única enzima E1 de activación activa la ubiquitina, y la combinación de algunas E2 de conjugación con los centenares de E3 ligasas, catalizan la ubiquitinación de innumerable cantidad de proteínas. Dentro de esta cascada enzimática, las E3 ligasas desempeñan un papel fundamental en la identificación de los sustratos y, junto con la E2 de conjugación, coordinan la unión de ubiquitina a sus sustratos (35).

Todas las E3 ligasas albergan un dominio de unión a la E2 de conjugación y se clasifican en base a la estructura de este dominio y el mecanismo de transferencia de ubiquitina. Teniendo esto en cuenta, las E3 ligasas se pueden dividir en 3 clases principales: (i) las E3 ligasas HECT (*homologous to E6-AP COOH-terminus*), que se pueden agrupar con las RBR (*RING-Between RING-RING*); (ii) las E3 ligasas con dominios RING-*finger* (RING, de su nombre en inglés *Really Interesting New Gene*); y, (iii) la última clase, compuesta por las E3 ligasas U-box. Cada una de estas familias posee distintos dominios de interacción para unirse a las E2 de conjugación. Asimismo, contienen otros dominios para el reclutamiento de los sustratos, o son capaces de formar complejos multiproteicos con subunidades que se encargan de reconocerlos (36, 37).

Las E3 ligasas HECT

Las E3 ligasas que contienen dominios HECT catalizan la transferencia de ubiquitina al sustrato mediante una reacción en dos etapas (**Figura 3A**). La ubiquitina se transfiere primero desde la E2 de conjugación a una cisteína catalítica en la E3 para formar una E3 ligasa tioéster intermedia, y luego desde la E3 ligasa al sustrato. El dominio HECT, altamente conservado, está ubicado en el extremo C-terminal de la proteína. Este dominio se caracteriza por una arquitectura bilobular: el lóbulo N-terminal interactúa con la E2 de conjugación cargada con la ubiquitina, mientras que el lóbulo en el C-terminal contiene la

cisteína catalítica. Los dos lóbulos están unidos por una “bisagra flexible” que permite el cambio en la orientación durante la transferencia de ubiquitina. Mientras que el dominio HECT C-terminal está involucrado en la catálisis, la especificidad de sustrato está determinada por la región N-terminal de la E3 ligasa. La actividad catalítica de estas E3 ligasas a menudo está regulada por interacciones intramoleculares que mantienen a la proteína en un estado autoinhibido que se libera en respuesta a varias señales. En humanos, existen aproximadamente 30 ligasas HECT (38).

De acuerdo con el N-terminal, las E3 ligasas HECT pueden clasificarse en tres subfamilias: (a) la familia Nedd4, que contiene motivos de triptófano-triptófano (W-W), (b) la familia HERC que posee uno o más dominios similares a RCC1 (*Regulators of Chromosome Condensation 1*) (RLDs), y (c) "otras" E3 ligasas HECT que contienen varios dominios (39, 40).

Las E3 ligasas RBR

En analogía con las E3 ligasas HECT, las E3 ligasas RBR (*RING-between RING-RING*) catalizan la transferencia de ubiquitina a través de una reacción en dos etapas donde la ubiquitina se transfiere a una cisteína catalítica en la E3 ligasa y luego al sustrato (**Figura 3B**). En estas E3 ligasas, el dominio RING1 recluta a la E2 de conjugación con la ubiquitina cargada, y el dominio RING2 posee la cisteína catalítica. Estas E3 ligasas contienen dominios adicionales específicos que regulan su actividad, mediante interacciones intramoleculares, interacciones proteína-proteína o modificaciones post-traduccionales (41).

Las E3 ligasas RING-Finger domain

Las E3 ligasas con dominios *RING-finger* pertenecen al tipo más abundante de E3 ligasas (**Figura 3C**). Estas E3 ligasas se caracterizan por la presencia de un dominio que contiene Zinc llamado *RING-finger*. Este dominio se une con la E2 de conjugación y de este modo promueve la transferencia de la ubiquitina al sustrato. Estas E3 ligasas no poseen actividad catalítica intrínseca y funcionan como un andamio para orientar la E2 de conjugación hacia el sustrato. Las E3 ligasas con dominios *RING-finger* pueden funcionar como monómeros, homodímeros o heterodímeros, y se pueden regular de diferentes maneras, incluyendo la modificación post-traducciona por adición de NEDD8, la fosforilación y la interacción con moléculas pequeñas (42).

Las E3 ligasas Cullin-RING domain (CRLs)

Dentro de las E3 ligasas con dominios *RING-finger*, se encuentra la familia de E3 ligasas *Cullin-RING domain* (CRLs). En las CRLs, la cullina actúa como una plataforma para el ensamblado de este complejo multiproteico. En su extremo N-terminal, la cullina se une a proteínas *RING-box*, que unen a la E2 de conjugación con la ubiquitina cargada. Por otra parte, el extremo C-terminal de la cullina interactúa con una proteína adaptadora que recluta a los receptores de sustratos (responsables de la especificidad de la E3 ligasa) (**Figura 3D**) (43). En humanos, existen 7 cullinas diferentes (CUL1, 2, 3, 4A, 4B, 5 y 7), y cada CRL puede ensamblar una E3 ligasa con diferentes receptores de sustrato. Los segmentos N-terminal de cada cullina se encuentran muy conservados entre las distintas especies, pero difieren entre las distintas cullinas. A través de esta región, las distintas cullinas se unen a adaptadores diferentes que a su vez interactúan con familias de receptores de sustratos distintas. Las cullinas deben ser activadas por la adición de NEDD8 para ser catalíticamente activas (44, 45).

APC/C

Otra E3 ligasa importante dentro de esta familia es APC/C (*Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*), un complejo multiproteico formado por muchas subunidades. Entre ellas se han descrito, una subunidad RING (Apc11) y una subunidad similar a las cullinas (Apc2) (46, 47).

Las E3 ligasas U-box

Las E3 ligasas con dominios U-box contienen un dominio de unión a la enzima E2 de conjugación, que adopta una estructura similar a la de las E3 ligasas con dominio RING, pero no contiene Zinc. Los dominios U-box son responsables de unir la E2 de conjugación con la ubiquitina cargada y promover la transferencia de la ubiquitina sobre el sustrato (**Figura 3E**). Como las E3 ligasas con dominios *RING-finger*, las E3 ligasas U-box catalizan la transferencia directa de la ubiquitina desde la E2 de conjugación al sustrato. Hay ocho E3 ligasas U-box en humanos, que pueden funcionar como monómeros u homodímeros (42).

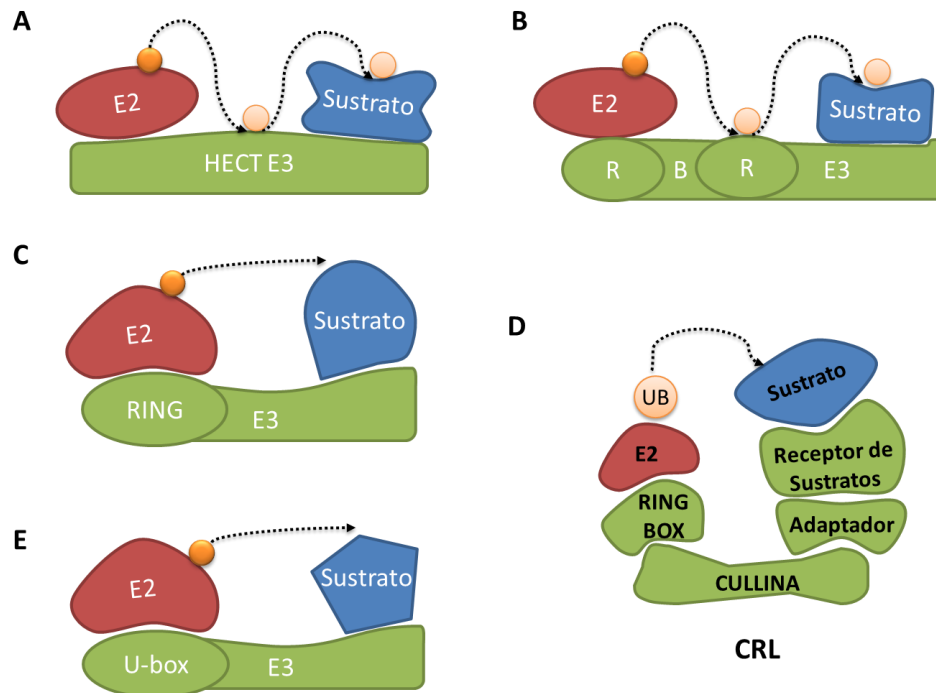


Figura 3. Familias de E3 ligasas. (A) Las E3 ligasas HECT. (B) Las E3 ligasas RBR. (C) Las E3 ligasas con dominios RING-finger. (D) Las E3 CRLs (pertenecen a la clase de E3 ligasas con dominios RING-finger). (E) Las E3 ligasas U-box. Las E3 ligasas HECT y las RBR contienen una cisteína catalítica que recibe la ubiquitina de la E2 de conjugación para formar una E3 ligasa tioéster intermedia y luego la transfieren al sustrato. Las E3 ligasas con dominios RING-finger y las U-box catalizan la transferencia directa de la ubiquitina desde la E2 de conjugación al sustrato.

La E3 ligasa CRL4Cdt2 cumple un rol clave en el control de la replicación del ADN y la proliferación celular

Como se mencionó anteriormente, dependiendo tanto de la estructura como de la secuencia proteica, las E3 ligasas se clasifican en diferentes familias. Entre las E3 ligasas eucariotas, las CRLs constituyen la familia más numerosa. En particular, los complejos CRL4 (*Cullina4-RBX1-DDB1-DCAF*) emplean a la proteína DDB1 para conectar la Cullina 4 con la familia de proteínas DCAFs (*DDB1- and Cul4-Associated Factors*), que actúan como receptores para cientos de sustratos. Cdt2 es un adaptador de sustrato DCAF que se asocia con el complejo CRL4 para formar la E3 ligasa CRL4^{Cdt2} (**Figura 4**) (48-50).

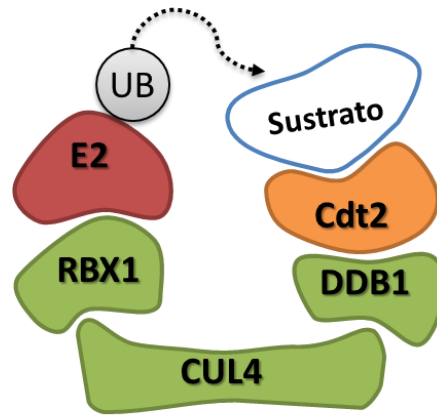


Figura 4. Estructura de la E3 ligasa $CRL4^{Cdt2}$. Las CRLs son E3 ligasas que contienen múltiples subunidades: una cullina, una proteína RING finger (RBX1 o RBX2) que se une a la enzima E2, un adaptador y un “receptor de sustratos” variable. La E3 Ligasa $CRL4^{Cdt2}$ (Cul4-DDB1-RBX1) tiene como receptor de sustratos a Cdt2.

La mayoría de los sustratos hasta ahora descritos de $CRL4^{Cdt2}$ tienen un dominio PIP (*PCNA Interacting protein*) que interactúa con PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) asociado a la cromatina, y es precisamente la unión de los sustratos a PCNA lo que asegura su degradación (**Figura 5**) (51, 52). Sin embargo, se ha encontrado otro sustrato de esta E3 ligasa, CHK1 (*Checkpoint Kinase 1*), cuya degradación es independiente de la unión a PCNA y ocurre en el nucleoplasma (53).

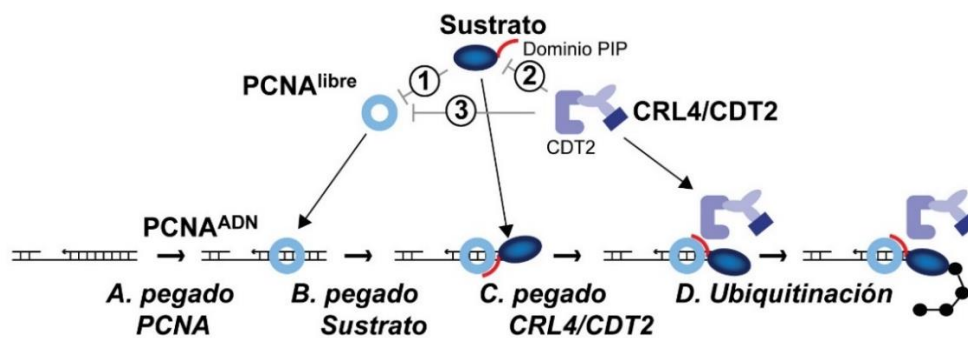


Figura 5. Modelo del mecanismo de acción de la E3 ligasa $CRL4^{Cdt2}$. La mayor parte de PCNA presente en las células se encuentra en la fracción soluble del núcleo ($PCNA^{libre}$). (A) Durante la replicación o la reparación del daño al ADN, PCNA se une a la cromatina ($PCNA^{ADN}$). (B) Los sustratos de Cdt2 pueden interactuar solo con $PCNA^{ADN}$. (C) En un sentido similar la E3 ligasa sólo puede interactuar con sus sustratos cuando estos están unidos a $PCNA^{ADN}$. (D) Cdt2 reconoce una estructura que forman el dominio PIP de sus sustratos y $PCNA^{ADN}$, restringiendo la ubiquitinación de sus sustratos a la fracción cromatínica. Modificado de Havens & Walter, 2011.

Más recientemente, se encontró que CRL4^{Cdt2} participa de un programa celular altamente conservado que controla la salida del ciclo celular y la diferenciación. Se ha demostrado que las interacciones funcionales de CRL4^{Cdt2} están conservadas desde nematodos a humanos, poniendo en evidencia el papel fundamental que esta E3 ligasa juega en la regulación de una adecuada proliferación celular (54).

El licenciamiento de los orígenes de replicación

El licenciamiento de los orígenes de replicación representa uno de los puntos de control más importante de la duplicación genómica (55). Este proceso ocurre durante la fase G1 del ciclo celular y consiste en el pegado de la helicasa replicativa MCM2-7 (*MiniChromosome Maintenance*) al origen de replicación. De este modo, el origen de replicación se mantiene en un estado “competente” para su posterior activación durante la fase S del ciclo celular. A medida que la replicación del ADN inicia, el complejo MCM2-7 se aleja dejando al origen de replicación otra vez en un estado “pasivo”, de modo que pueda ser licenciado nuevamente al comienzo del próximo ciclo celular (56).

Para que el proceso de licenciamiento del ADN tenga lugar se requiere la acción conjunta de por lo menos tres proteínas: un complejo multiproteico denominado ORC (complejo de reconocimiento del origen), CDC6 (*Cell Division Cycle 6*) y CDT1. Conforme con este modelo, una vez que MCM2-7 ha sido cargado sobre el ADN, ORC, CDC6 y CDT1 ya no son necesarios para que MCM2-7 permanezca sujeto a la cromatina y se disocian, dejando el origen de replicación en estado “licenciado”. El conjunto de estas proteínas (ORC, CDC6, CDT1 y MCM2-7) se denomina complejo pre-replicativo (*pre-Replicative Complex, pre-RC*, **Figura 6**) (57).

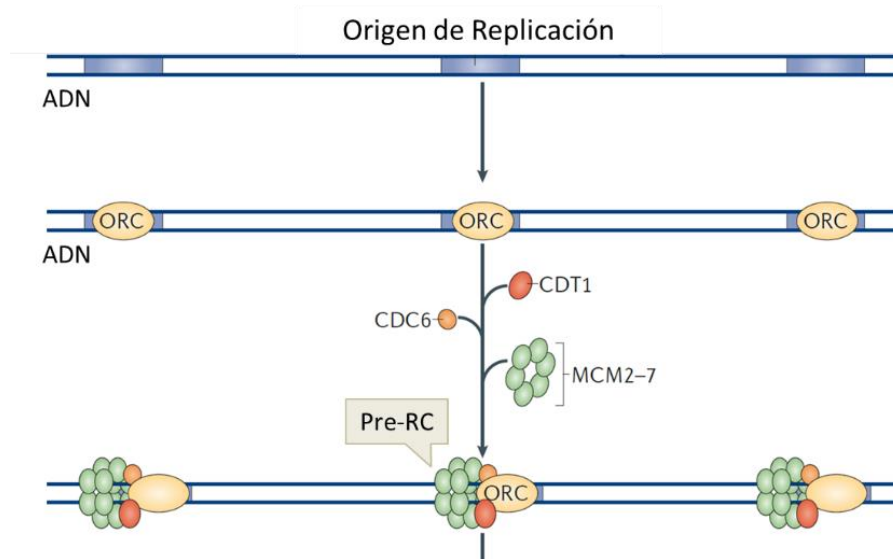


Figura 6. Formación del complejo pre-replicative sobre los orígenes de replicación. En eucariotas, el complejo de reconocimiento del origen (ORC) es el responsable de reconocer directamente los orígenes de replicación. Después de que el ORC se une a un origen, dos factores, CDC6 y CDT1, son reclutados y tienen la función de promover el pegado del complejo MCM2-7. MCM2-7 forma un anillo alrededor de los orígenes de replicación y promueve el desenrollamiento de la estructura de doble hélice del ADN gracias a su función helicasa. Modificado de Fragkos, *et al.*, 2015.

La E3 ligasa CRL4^{Cdt2} y su rol en la replicación y reparación del ADN

El licenciamiento de los orígenes de replicación es un proceso altamente dinámico y debe estar cuidadosamente regulado para garantizar la correcta duplicación cromosómica. Entre los sustratos mejor caracterizados de CRL4^{Cdt2} se encuentra el factor de licenciamiento de replicación CDT1 (*Cdc10-dependent transcript 1*). La degradación de CDT1 ocurre constitutivamente durante la fase S del ciclo celular, y este proceso es crítico para prevenir el re-licenciamiento de los orígenes de replicación en un mismo ciclo celular. Además, la degradación de CDT1 se produce como respuesta al daño al ADN, y participa del proceso de reparación que representa un mecanismo esencial para mantener la estabilidad genómica (58-61). Se ha demostrado que variaciones de los niveles de Cdt2, y consiguientes alteraciones de los niveles de CDT1, son suficientes para provocar serias alteraciones en el estado de licenciamiento de las células (62).

En simultáneo, varias publicaciones reportaron que p21 es un sustrato de Cdt2. En estos trabajos se demostró que la estabilización de los niveles de p21 inhibe a la Ciclina-CDK2, y previene la salida del núcleo e inactivación del factor de replicación CDC6. Por otra

parte, hay evidencias que también sugieren que CRL4^{Cdt2} promueve la reparación del ADN regulando los niveles proteicos de p21 (63-65).

En ausencia de daño al ADN, la E3 ligasa CRL4^{Cdt2} puede monoubiquitinar directamente PCNA en células proliferativas (66). Asimismo, en *Caenorhabditis elegans*, CRL4^{Cdt2} controla la degradación de Pol η , limitando la síntesis de ADN por translesión que lleva a cabo esta polimerasa durante la reparación del ADN, y que puede generar mutaciones (67).

En *Drosophila melanogaster*, CRL4^{Cdt2} promueve la degradación del factor de transcripción E2F1 durante la fase S del ciclo celular. Al igual que los sustratos hasta ahora descritos, la ubiquitinación de E2F1 requiere la asociación de este con PCNA. El aumento de los niveles de este factor de transcripción acelera la progresión de la fase S del ciclo celular e induce la apoptosis (68).

La E3 ligasa CRL4^{Cdt2} y su rol en la reorganización de la cromatina

Además de los mencionados anteriormente, entre los sustratos conocidos de CRL4^{Cdt2} (**Figura 7**), se encuentra Set8 (PR-Set7 o KMT5A), una metiltransferasa de histonas que monometila la lisina 20 de la histona 4. La ausencia de Set8 no sólo afecta la condensación de la cromatina, sino que además, arresta a las células en G2 (69). Los niveles de expresión de Set8 están regulados por distintas E3 ligasas durante la progresión del ciclo celular. Si bien durante G1 los niveles proteicos de Set8 son regulados por APC/C^{Cdh1} y CRL1^{Skp2} (70, 71), la ausencia de Set8 durante la fase S del ciclo celular o después del daño al ADN se debe a la acción de la E3 ligasa CRL4^{Cdt2} (72-76).

Recientemente se han identificado nuevos sustratos de CRL4^{Cdt2} involucrados también con el ensamblado de la cromatina. Por un lado, CRL4^{Cdt2} regula los niveles proteicos de TDG (*Thymine DNA Glycosylase*). Esta enzima, involucrada en la desmetilación del ADN, cumple un rol importante durante la reparación (77, 78). Otro sustrato de la E3 ligasa CRL4^{Cdt2} es MMSET (*Multiple myeloma SET domain-containing protein*), una metiltransferasa de histonas que interviene en la formación del complejo pre-replicative (79).

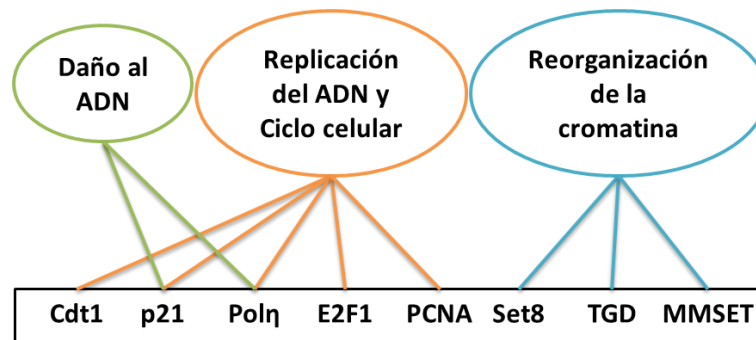


Figura 7. La E3 ligasa $CRL4^{Cdt2}$ regula los niveles proteicos de varios sustratos. Cdt2 reconoce los sustratos indicados y promueve su degradación para regular diversos mecanismos celulares tales como la transcripción, la remodelación de la cromatina y la reparación del ADN. Modificado de Abbas & Dutta, 2011.

La E3 ligasa CRL4 y su interacción con modificadores epigenéticos

Los nucleosomas, unidades fundamentales de la cromatina, están formados por ADN (aproximadamente 146 pares de bases) y un octámero de histonas (compuesto por un tetrámero de histonas H2A y H2B y un tetrámero de histonas H3 y H4). El dominio globular de las histonas interactúa con el ADN, mientras que las colas de estas sobresalen del nucleosoma y están sujetas a múltiples modificaciones, entre las que se puede mencionar la fosforilación, la acetilación, la ubiquitinación y la metilación (80). Las modificaciones de las histonas alteran la estructura de la cromatina, y están implicadas en la regulación de la expresión génica, la replicación y la reparación del ADN (81). Estudios recientes indican que las E3 ligasas CRL4 regulan la metilación de las histonas y, por consiguiente, controlan el estado epigenético de las células y la diferenciación (82, 83).

Por un lado, se encontró que una E3 ligasa $CRL4^{WDR5}$ regula la metilación de la histona 3 en la lisina 4 (H3K4). Al igual que el silenciamiento de WDR5, la inactivación de la Cullina4 o de DDB1 por medio de ARN de interferencia reduce drásticamente los niveles de mono y trimetilación de la H3K4. La participación funcional de $CRL4^{WDR5}$ en la metilación de la H3K4 respaldan la idea de que la ubiquitinación está sumamente relacionada con la regulación dinámica de las marcas epigenéticas en las histonas. Por otro lado, también se observó que el silenciamiento de la Cullina4 y DDB1 reducen significativamente los niveles de la histona 3 tri-metilada en las lisinas 9 y 27 (H3K9 y H3K27), pero no se determinó cuál es el receptor de sustrato involucrado en este proceso, sugiriendo que otra CRL4 podría estar implicada en la regulación específica de estos mecanismos epigenéticos (83).

Utilizando la levadura como modelo, se pudo determinar que la Cullina4 se asocia con una metiltransferasa de histonas (Crl4) para regular el ensamblado de la cromatina, mediante la metilación de la Histona 3 en la lisina 9 (H3K9) (82). Asimismo, en *Neurospora crassa*, los componentes de CRL4 son esenciales para la metilación del ADN y para la trimetilación en la H3K9 catalizada por la metiltransferasa DIM-5, con la cual CRL4 se encuentra asociada (84).

En línea con lo anterior, CRL4^{DDB2} también está implicada en la ubiquitinación de la histona H2A, que es un requisito previo en la metilación de las histonas H3 y H4 y participa en la reparación del ADN (85). Además, la E3 ligasa CRL4 es capaz de ubiquitinar directamente la histona 3 y la 4 en respuesta al daño al ADN para promover la reparación (86).

Por todo lo expuesto anteriormente, queda ampliamente demostrada la íntima relación entre la E3 ligasa CRL4 y la regulación post-traducciona de histonas, que tiene un rol fundamental en la regulación epigenética y en la reparación del ADN.

Potencial terapéutico de las E3 ligasas en cáncer

La formación y progresión de tumores está regulada, en última instancia, por la abundancia y la actividad de factores proteicos oncogénicos o supresores tumorales (87). En células eucariotas, la homeostasis proteica está finamente regulada por la ubiquitinación, que como se mencionó anteriormente, consiste en una compleja red enzimática encargada de transferir múltiples moléculas de ubiquitina a un sustrato y, de este modo, promover su degradación a través del proteosoma o regular su actividad. Por lo tanto, es de esperar que el estudio a nivel molecular de la cascada de ubiquitinación, junto con el desarrollo de compuestos que modulan sus componentes específicos, pueda facilitar el desarrollo y mejoramiento de tratamientos de distintas patologías (35). En particular, la aprobación del inhibidor de proteosoma *Bortezomib* para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple ha puesto en evidencia el gran potencial terapéutico de esta vía enzimática en el tratamiento del cáncer (88-91). Sin embargo y a pesar del indiscutible valor de esta clase de inhibidores, el mecanismo molecular de acción exacto todavía no ha sido esclarecido en detalle. La amplia respuesta biológica y la toxicidad inducida por este tipo de moléculas

sugieren que el mejor punto para la intervención terapéutica sería la inhibición de componentes más específicos de la cascada de ubiquitinación. En este sentido, el grupo de E3 ligasas representa un excelente candidato, debido a que este tipo de enzimas son los efectores finales de la cascada de ubiquitinación y, por ende, son responsables de su especificidad (35, 92).

CRL4^{Cdt2} es un potencial blanco terapéutico en el tratamiento del cáncer

La E3 ligasa CRL4^{Cdt2} tiene un rol fundamental en las células, asegurando una adecuada progresión del ciclo celular (48). Por lo tanto, no es sorprendente que diferentes evidencias indiquen que alteraciones en los niveles de CRL4^{Cdt2} contribuyan a la aparición y progresión de distintos tipos de cáncer (93). En este sentido, se ha demostrado que la expresión de Cdt2 se encuentra frecuentemente elevada en carcinomas hepatocelulares agresivos y que sus niveles se correlacionan positivamente con el grado de malignidad de los tumores y una baja supervivencia de los pacientes. Otros estudios han demostrado también que la expresión de Cdt2 se encuentra elevada en cáncer de mama, gástrico, de ovario y en un subconjunto de pacientes con sarcoma de Ewing con pronóstico clínico adverso (93-96). En conjunto, estos resultados ponen en evidencia el potencial valor pronóstico de la sobre-expresión de Cdt2 como biomarcador en una amplia variedad de tipos de cáncer.

Es importante remarcar que se ha reportado que la inhibición de la E3 ligasa CRL4^{Cdt2} es responsable de los efectos genotóxicos y antitumorales del compuesto MLN4924, un inhibidor farmacológico que inactiva todas las E3 CRLs. Estudios clínicos indican que el MLN4924 es un nuevo compuesto prometedor para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, subrayando el potencial farmacológico y terapéutico de la modulación de la actividad de CRL4^{Cdt2} en el tratamiento del cáncer (97).

G9a y GLP: los represores de la transcripción génica

Dependiendo del estado de condensación, la cromatina se puede clasificar en eucromatina y heterocromatina. La eucromatina es la forma no condensada y se asocia con las regiones genómicas que son transcripcionalmente activas. La heterocromatina, en cambio, está compactada y puede existir en dos formas; (i) facultativa, que participa en la expresión génica y (ii) constitutiva, que está silenciada permanentemente. El papel de las

modificaciones postraduccionales de las histonas, especialmente la metilación, ha sido un tema de investigación en rápido crecimiento en las últimas décadas. Mientras que la acetilación de histonas mantiene la transcripción génica activa, la metilación de histonas es una marca epigenética que puede promover tanto la activación transcripcional de genes como su represión (98).

Las metiltransferasas de histonas GLP y G9a (codificadas por los genes Ehmt1 y Ehmt2) forman un complejo heteromérico y catalizan la mono- y la di-metilación de la Histona 3 en la Lisina 9. Esta modificación en las histonas está relacionada con la represión transcripcional y con la formación de la heterocromatina, debido a su interacción con HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) (99, 100). Además, G9a también posee la capacidad de metilar otras proteínas y de autometilarse. Esta última modificación es necesaria también para la interacción de G9a con HP1 (101, 102).

G9a y GLP son proteínas que pertenecen a la familia de metiltransferasas de histonas que contienen un dominio SET, y son homólogas en su secuencia y en su estructura (**Figura 8**). Ambas proteínas cuentan con un dominio de activación de la transcripción (TAD); un dominio rico en cisteínas (Cys); un región que contiene dominios Anquirina (ANK), mediante los cuales interactúan con la histona 3 metilada en la lisina 9; y por último, un dominio SET mediante el cual estas dos proteínas interactúan (103, 104).

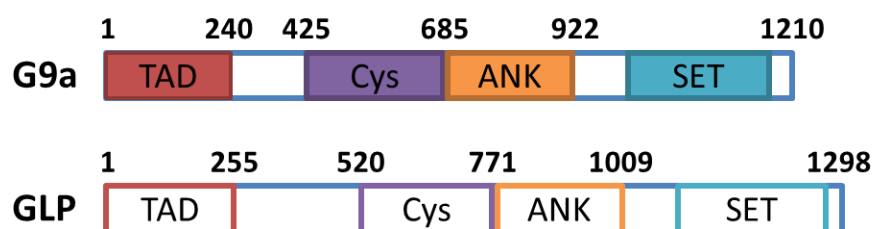


Figura 8. Estructura proteica de G9a y GLP. Estas proteínas cuentan con un dominio de activación de la transcripción (TAD); un dominio rico en cisteínas (Cys); una región que contiene dominios Anquirina (ANK); un dominio SET en el C-terminal.

Si bien ambas proteínas tienen actividad metiltransferasa intrínseca, mediante la introducción de mutaciones puntuales en sus dominios SET, se ha demostrado que la actividad catalítica del complejo G9a/GLP depende sólo de G9a. En este sentido, utilizando líneas *knockout* para la expresión de las metiltransferasas, se verificó que cuando se re-expresaban estos mutantes catalíticos en la línea que no expresaba G9a, la actividad

metiltransferasa no se restituía. En cambio, en la línea que no expresaba GLP (pero sí G9a), la reintroducción de los mutantes no catalíticos de GLP era capaz de recuperar los niveles de metilación de la histona 3 en la lisina 9 en diferentes proporciones. El porcentaje en el cual estos mutantes recuperaban la actividad catalítica se correlacionaba con la capacidad de estos de interactuar con G9a (**Tabla 1**) (105).

Tabla 1. Mutantes Catalíticos de G9a y GLP. Diferentes mutantes puntuales de G9a y GLP en el dominio SET terminal difieren en su capacidad de formar heterodímeros, y también en la capacidad de recuperar la actividad catalítica cuando interactúan para la formación de este complejo. Datos reportados por Tachibana, *et al.*, 2008.

Construcción	Capacidad de interactuar para formar el heterodímero	Capacidad de recuperar los niveles de metilación de la H3K9 cuando puede heterodimerizar
G9a	+++	+++
G9a-Del1112-1115	-	-
G9a-C1115A	++	-
G9a-NHLE	+/-	-
GLP	+++	+++
GLP-Del1198-1201	-	-
GLP-C1201A	+++	++
GLP-NHLE	++	+

El complejo G9a/GLP se localiza en la cromatina debido a interacciones múltiples del complejo con otras proteínas que poseen la capacidad de unirse al ADN. Recientemente se encontró que ZNF644 y WIZ interactúan con el dominio TAD de G9a y GLP, respectivamente (**Figura 9A**). Estas proteínas contienen múltiples motivos *Zinc-finger* que reconocen secuencias consenso de ADN y median la interacción del complejo con la cromatina (**Figura 9B**) (106). Asimismo, se ha reportado que todo el complejo se asocia a los orígenes de replicación, que en las células ZNF644 colocaliza con PCNA y que sus niveles en el replisoma se correlacionan positivamente con los niveles de G9a/GLP y WIZ (107). En línea con lo anterior, se ha descrito que G9a también colocaliza con los orígenes de replicación, y que el complejo formado por G9a/GLP es necesario para la metilación de las histonas que se asocian al ADN recién sintetizado (108).

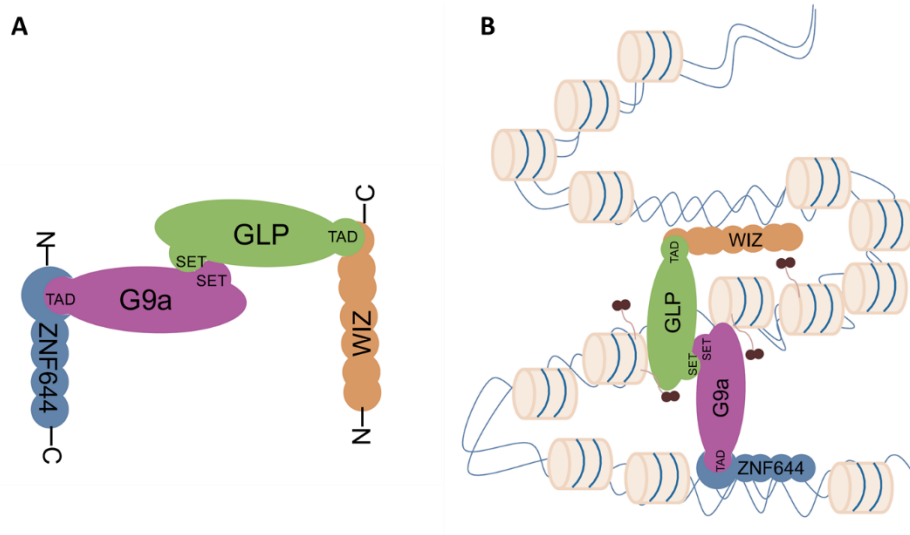


Figura 9. El complejo formado por G9a/GLP/ZNF644 y WIZ. (A) El modelo muestra que el N-terminal de ZNF644 interactúa con el dominio TAD de G9a, mientras que el C-terminal de WIZ interactúa con el dominio TAD de GLP. (B) ZNF644 y WIZ facilitan la localización del complejo G9a/GLP en la cromatina. Tomado de Bian, *et al.*, 2015.

G9a y cáncer

En los últimos años, se han multiplicado los estudios sobre G9a, evidenciando el rol central que esta metiltransferasa cumple en la regulación de numerosos procesos biológicos, como la diferenciación y la reparación del ADN. En línea con estas observaciones, se ha reportado que los niveles de expresión de G9a se encuentran aumentados en varios tipos de tumores y que su silenciamiento, en células cancerosas, inhibe la proliferación, conduce a la inestabilidad cromosómica y reduce notablemente el crecimiento tumoral (109, 110). Asimismo, se comprobó que la expresión de G9a es necesaria para la correcta reparación del ADN y está relacionada con la supervivencia de las células tumorales en condiciones de estrés (110-112). En concordancia con lo anterior, publicaciones recientes confirman que el uso del inhibidor de G9a (UNC0638), en combinación con dosis bajas de agentes que causan daño al ADN, atenúa selectivamente la proliferación de células cancerosas, la metástasis y la invasión (113, 114).

Por último, se ha observado que G9a está sobre-expresado en carcinomas de células escamosas esofágicas, carcinomas hepatocelulares, cáncer de pulmón y de cerebro, mieloma múltiple y carcinoma de ovario. Asimismo, en muchos casos se observó que el aumento en los niveles de expresión de G9a se correlaciona con un mal pronóstico, como

consecuencia del incremento de los niveles de metilación de promotores de genes supresores de tumores (115-120).

Todas estas evidencias, confirman que la desregulación de los niveles de expresión de G9a podría ser desencadenante de la transformación maligna tumoral de las células afectadas.

Reparación del daño al ADN

La integridad genómica y la correcta replicación del ADN son esenciales para prevenir mutaciones y reordenamientos cromosómicos, que de lo contrario pueden conducir al desarrollo de distintas enfermedades. El daño al ADN es generado por varios agentes genotóxicos diferentes, como las especies reactivas de oxígeno, la luz ultravioleta y los productos químicos mutagénicos. Estos agentes causan diferentes tipos de daño en el ADN, que van desde daños en una base nucleotídica hasta roturas de la doble cadena (DSB, de su nombre en inglés *double strand breaks*). Los DSB se encuentran entre los tipos de daño más citotóxicos (121, 122) y la recombinación no homóloga (NHEJ, Non-homologous end joining) y la recombinación homóloga (HR, *Homologous recombination*) representan las dos vías principales de reparación de DSB (**Figura 10**).

Recombinación no homóloga (NHEJ)

Esta vía de reparación es relativamente simple y puede tener lugar durante todo el ciclo celular. Ambos extremos de la ruptura del ADN se unen primero al heterodímero formado por Ku70/Ku80, que recluta la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PKcs). Si es necesario, los extremos pueden ser recortados por nucleasas (como *Artemis*) o rellenados por ADN polimerasas (como Pol μ o Pol λ) para crear extremos compatibles. Finalmente, el complejo de ligación une los extremos de las cadenas de ADN. Este complejo está formado por la ADN-ligasa IV, XRCC4 (*X-ray cross-complementation group 4*) y XLF (*Xrcc4 like factor*)/Cernunnos (123).

Recombinación homóloga (HR)

El mecanismo de reparación por recombinación homóloga utiliza la cromátida hermana como plantilla para la reparación precisa del ADN dañado, por lo que se puede llevar a cabo en las fases S y G2 del ciclo celular, cuando el ADN se ha replicado. Sin

embargo, la HR también puede provocar inserciones o deleciones, cuando las cadenas de ADN no están correctamente alineadas. Luego del daño al ADN, este mecanismo se inicia con la eliminación de los extremos del ADN dañado gracias al complejo MRN (formado por las proteínas Mre11-Rad50-Nbs1), junto con la proteína interactora de CtBP (CtIP) y otras exonucleasas. Esto genera un extremo de ADN monocatenario que se recubre por la proteína RPA (*Replication protein A*), para evitar la formación de estructuras secundarias (124). Posteriormente, BRCA2 media la sustitución de RPA por RAD51, para formar un filamento de nucleoproteína que busca la secuencia homóloga en la cromátida hermana. Después de que las cadenas se encuentran apareadas, RAD51 y otras proteínas catalizan la extensión desde el extremo del ADN utilizando la secuencia intacta como plantilla. Finalmente, se ligan ambos extremos (125, 126).

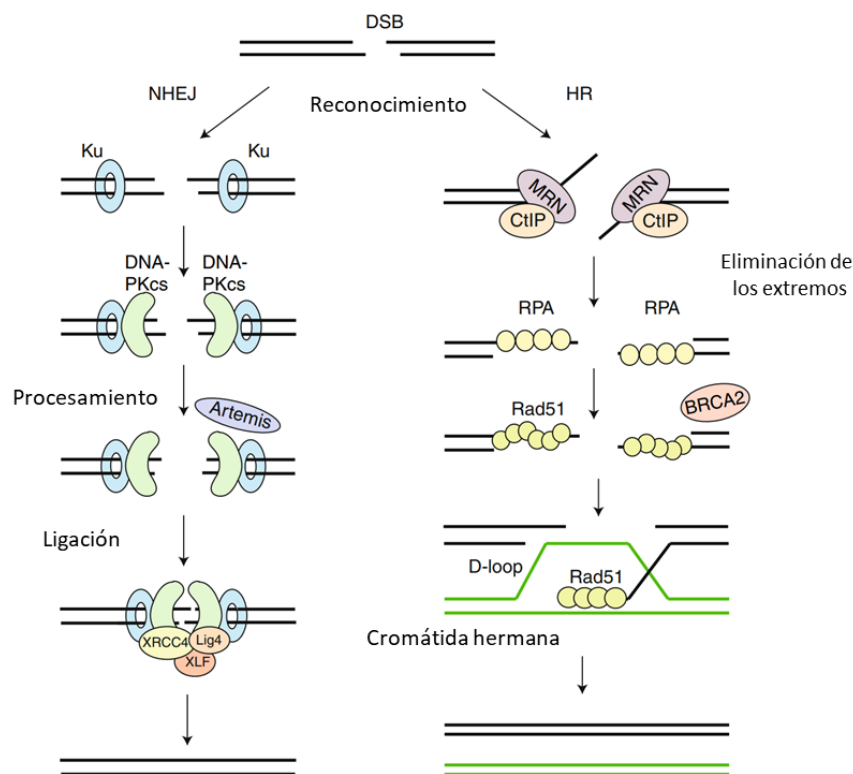


Figura 10. Reparación de DSB. (A) La NHEJ comienza con el reconocimiento del ADN dañado al que se une el heterodímero Ku70/80, que recluta DNA-PKcs. Si los extremos son incompatibles, las nucleasas (Artemis) pueden recortar los extremos. El complejo de ligación sella la ruptura. (B) En la HR el complejo MRN-CtIP inicia la eliminación de los segmentos dañados para generar ADN monocatenario. Este es recubierto por RPA, que posteriormente es reemplazado por Rad51 con la ayuda de BRCA2. Estos filamentos de nucleoproteína Rad51-ADN, se aparean con la secuencia homóloga. Finalmente, la extensión de la cadena y la unión con el otro extremo conducen a la reparación. Modificado de Brandsma & Gent, 2012.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Basado en lo expresado anteriormente se desprende que la E3 ligasa CRL4^{Cdt2} representa un blanco terapéutico atractivo para muchos tipos de cáncer. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual CRL4^{Cdt2} ejerce su función pro-tumorigénica aún no se conoce con exactitud. Como CRL4^{Cdt2} es una E3 ligasa, las variaciones fenotípicas inducidas por cambios en los niveles de Cdt2 son una consecuencia directa de la acción de CRL4^{Cdt2} sobre sus sustratos.

Por lo tanto, la identificación de nuevos sustratos de Cdt2 relevantes en el control de su función podría contribuir a la comprensión del mecanismo de acción de CRL4^{Cdt2} en los procesos tumorigénicos.

Objetivos

Objetivo general

Con el fin de comprender el mecanismo de acción de CRL4^{Cdt2} en los procesos tumorigénicos el objetivo general de la presente tesis es contribuir a la identificación y caracterización molecular de nuevos sustratos de CRL4^{Cdt2} con el propósito de revelar posibles nuevos puntos de intervención terapéutica para el desarrollo de tratamientos contra el cáncer.

Objetivos específicos

- I. *Identificación de proteínas que interactúan con Cdt2.*
- II. *Caracterización de los sustratos de CRL4^{Cdt2} identificados.*
- III. *Estudio de la relevancia biológica de la degradación de los sustratos CRL4^{Cdt2} identificados.*
- IV. *Caracterización del rol que la degradación de los sustratos CRL4^{Cdt2} identificados posee en el control y regulación de la homeostasis de las células tumorales.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Vectores y Construcciones

En este trabajo se utilizaron los plásmidos detallados a continuación:

Tabla 2. Listado de construcciones utilizados.

Nombre de la construcción	Vector	Etiqueta	Origen
G9a-FL	pcDNA3	FLAG	Dr. Eiji Jara
G9a-922	pcDNA3	FLAG	Dr. Eiji Jara
G9a-685	pcDNA3	FLAG	Dr. Eiji Jara
G9a-425	pcDNA3	FLAG	Dr. Eiji Jara
mGLP-FL	pcDNA3	FLAG	Dr. Eiji Jara
mGLP-1009	pcDNA3	FLAG	Dr. Eiji Jara
mGLP-771	pcDNA3	FLAG	Dr. Eiji Jara
Cdt2	pcDNA3	Myc	Dr. Mario Rossi
Cdt2	pcDNA3	FLAG	Dr. Mario Rossi
Cdt2-399	pcDNA3	FLAG	Dr. Mario Rossi
Cdt2-576	pcDNA3	FLAG	Dr. Mario Rossi
FLAG-TR-TUBE	pcDNA3	FLAG	Dr. Michele Pagano
FLAG-TR-TUBE mutante	pcDNA3	FLAG	Dr. Michele Pagano
shCdt2	pLL3.7	---	Dr. Mario Rossi
Cdt2-TetOn	pTRIPZ	FLAG	Dr. Michele Pagano

Preparación de bacterias competentes

Bacterias *Escherichia coli* cepa DH5 α fueron utilizadas como fuente de bacterias competentes. Para alcanzar la competencia, las bacterias fueron sembradas en una placa de LB-agar libre de antibiótico suficientemente diluidas como para obtener colonias individuales, e incubadas a 37°C por 16h. Una colonia fue picada y crecida durante 16h en 5ml de medio LB en agitación (200rpm, 37°C). Una vez alcanzada la saturación, se inocularon 200ml del LB nuevo que se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 medida a 600nm para estimar el crecimiento del cultivo. Luego se centrifugó por 10min a 3000rpm y el *pellet* bacteriano se resuspendió en 100ml de CaCl₂ 100nM frío. La suspensión de bacterias se centrifugó nuevamente a 4°C por 10 min a 3000rpm. El *pellet* fue resuspendido en 5ml de CaCl₂ 100nM e incubado en hielo por 30min.

Posteriormente, 200µl de la suspensión de bacterias fueron alicuotadas en tubos *ependorf* con el agregado de glicerol hasta alcanzar una concentración final del 15%. Finalmente, las bacterias fueron conservadas a -80°C .

Transformación bacteriana y aislamiento de plásmidos

Se siguió el protocolo de transformación descrito por Sambrook (Sambrook et al., 2001) modificado a partir del original de Hanahan (Hanahan, 1983).

Para la transformación, 50 µl de bacterias competentes DH5α de eficiencia al menos 1×10^6 colonias/ml, almacenadas a -80°C fueron descongeladas lentamente en hielo granizado. Una vez descongeladas se agregaron entre 50ng y 1µg de plásmido, y se las incubó 30min en hielo. Rápidamente, se les aplicó un shock térmico de 30 seg a 42°C y nuevamente se las colocó en hielo por 3 minutos. Luego, se agregaron 700µl de medio LB sin antibiótico durante 45-60 min a 37°C . Finalmente, se tomaron cantidades variables de bacterias en LB (entre 50-500µl), dependiendo de la calidad y cantidad inicial del plásmido y se plaquearon en placas de LB con el antibiótico correspondiente.

Preparación de plásmidos a pequeña escala (mini-preparaciones)

Se utilizó el método de Birnboim y Doly (Birnboim y Doly, 1979). Tubos de vidrio conteniendo 3ml de medio LB con el antibiótico de selección correspondiente fueron inoculados con bacterias provenientes de colonias individuales portadoras del plásmido de interés o de glicerol guardados. Los cultivos fueron crecidos por 16 h a 37°C en agitación a 200rpm. Luego, 1,5ml de cultivo fueron trasvasados a tubos tipo *ependorf* y centrifugados a 2000rpm, 5min. El pellet celular fue resuspendido en 300µl de P1 (Tris-HCl 50mM pH 7,5; EDTA 10mM) conteniendo RNAsa A (50µg/ml). Luego, 300µl de P2 (NaOH 0,2N; SDS 1%) fueron agregados, mezclados por inversión y mantenidos por 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 300µl de P3 (KAcO 3M pH 5,2) fría, se incubó la mezcla en hielo durante 20 min y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. 700µl del sobrenadante fueron precipitados con un volumen de isopropanol, y el pellet se lavó con 1ml de etanol 70%. El pellet finalmente se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 20µl de H₂O. Para la preparación de plásmidos a pequeña escala también *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) según especificaciones del proveedor.

Análisis de plásmidos por enzimas de restricción

Todos los plásmidos utilizados en este trabajo fueron analizados mediante mapeo por enzimas de restricción para asegurar la utilización de los plásmidos correctos. Para ello varias mini-preparaciones de DNA plasmídico fueron verificadas simultáneamente. 2-3 μ l de DNA plasmídico proveniente de minipreparaciones fue sometido a digestión por enzimas de restricción siguiendo el siguiente protocolo: 2-3 μ l de DNA plasmídico, 2 μ l de buffer de restricción, 0,5 U de la enzima de restricción elegida y H₂O hasta completar 20 μ l de volumen final. Las mezclas fueron incubadas durante 2h a 37°C. Luego las bandas obtenidas fueron resueltas mediante electroforesis en geles de agarosa de entre 0,6-2% en buffer TBE (Tris-HCl 25mM, Ácido Bórico 100mM; EDTA 10mM, pH 8,0) con bromuro de etidio. El porcentaje final de agarosa de los geles fue determinado según el tamaño de las bandas esperadas. Finalmente, las bandas fueron observadas en un transiluminador UV y documentadas de forma digital.

Preparación de plásmidos a gran escala (maxi/mega-preparaciones)

Los plásmidos chequeados fueron sujetos a amplificaciones a gran escala para obtener una masa suficiente para los experimentos de transfecciones mediante el uso de columnas de afinidad (QIAGEN). Brevemente, 250ml de medio LB con el antibiótico de selección adecuado, fueron inoculados con bacterias provenientes de colonias individuales portadoras del plásmido de interés o stock guardados con glicerol a -80°C. Los cultivos fueron crecidos por 16 h aproximadamente a 37°C en agitación a 200 rpm y luego cosechados por centrifugación (6000g por 15min a 4°C). El pellet celular fue resuspendido en 10 ml de P1 (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; EDTA 10 mM) con RNAsa A (50 μ g/ml). Se lisaron las células por desnaturalización alcalina agregando 10ml de P2 (NaOH 0,2N; SDS 1%) y manteniendo por 5min a temperatura ambiente. Luego, se neutralizó el lisado con 10ml de P3 (KAcO 3M pH 5,2) helada, se incubó la mezcla en hielo durante 20 min y se centrifugó a 20000g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue filtrado en un embudo con gasa y volcado en una columna QIAGEN-tip 500 (para maxipreparaciones). La columna fue eluida por gravedad y lavada dos veces con 30ml de buffer de lavado QC. Finalmente, el DNA retenido en la columna fue eluído con 15ml buffer de elución QF. El DNA del eluído fue precipitado con 0,7 volúmenes de isopropanol en tubos COREX y centrifugado a 15000g. El

DNA precipitado fue lavado dos veces con etanol 70% y el pellet fue secado al aire durante 20 min y resuspendido en H₂O. La calidad del DNA plasmídico se verificó por geles de agarosa y la concentración final se cuantificó por absorbancia con un *Nanodrop* (Thermo Scientific).

Líneas celulares

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares: HEK293T (embrionarias renales); U2OS (provenientes de osteosarcoma) y HeLa (provenientes de adenocarcinoma de cérvix).

Todas ellas fueron cultivadas rutinariamente con medio DMEM (alta glucosa) suplementado con L-glutamina (2mM), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 g/ml y suero fetal bovino (FBS) al 10%. Todos los reactivos fueron adquiridos en Invitrogen salvo el suero, adquirido en Natocor. Las líneas celulares fueron incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Las líneas se mantuvieron en crecimiento con pasajes cada 72-96hs de una dilución 1:10. Para el mantenimiento, las células fueron lavadas con PBS 1X y despegadas del plástico adherente en presencia de tripsina 1 min a 37°C.

Transfecciones transitorias y transducción de líneas celulares

Transfección de DNA

Las transfecciones de ADN se realizaron con PEI (polietilenimina, SIGMA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, el procedimiento para una placa de 100 mm de diámetro es el siguiente: se colocaron 5 µg totales de ADN plasmídico en un tubo *eppendorf* con 250µl de cloruro de sodio 150mM. En simultáneo se colocaron 30 µl de PEI, en un segundo tubo *eppendorf* con 220µl de cloruro de sodio y se incubó por 5 min. Posteriormente se transfirió la mezcla de ADN plasmídico al tubo con el agente de transfección y se mezcló vigorosamente. Se permitió la formación de complejos entre el ADN y el agente de transfección por incubación durante 15 minutos, luego de lo cual se agregó la mezcla sobre las células por goteo. Luego de 6 horas se cambió el medio por DMEM 10% SFB. Como control de transfección en general el plásmido de interés se co-transfectó con un vector de expresión de proteínas fluorescentes en proporción 1:20.

Transfección de ARN de interferencia

Las transfecciones de ARN de interferencia (ARNi) se realizaron con Lipofectamina *RNAiMax* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, el procedimiento para una placa de 60 mm de diámetro es el siguiente: se colocaron 60 picomoles totales de ARN de interferencia en un tubo *eppendorf* con 250µl de OptiMEM (Invitrogen). En simultáneo se colocaron 8 µl de Lipofectamina *RNAiMax*, en un segundo tubo con 250µl de OptiMEM y se incubó por 5 min. Posteriormente se transfirió la mezcla de ARNi al tubo con el agente de transfección y se mezcló vigorosamente. Se permitió la formación de complejos entre el ARN de interferencia y el agente de transfección por incubación durante 15 minutos, luego de lo cual se agregó la mezcla sobre las células por goteo. Se incubó a las células durante 6 horas a 37°C y a 5% CO₂ para la transfección y luego se cambió el medio por DMEM 10% SFB. 48 hs después de la transfección se realizaron los experimentos. Los ARNi utilizados en el presente trabajo fueron adquiridos en *GE Healthcare Dharmacon* (*ON-TARGETplus SMARTpool*: DTL, L-020543-00-0005; EHMT1, L-007065-02-0005; EHMT2, L-006937-00-0005; ZNF644, L-031240-01-0005; WIZ, L-007085-02-0005).

Síntesis de partículas virales

Se transfectaron células HEK293T que se encontraban en un 70-80% de confluencia, haciendo uso del reactivo PEI, con los plásmidos VSVG/Gag-Pol (retrovirus) o VSVG/PdPAX (lentivirus) y el plásmido de interés en una proporción 2:2:1, con una masa final de 2,5 y 5 µg para placas de 60 y 100 mm respectivamente. Se cambió el medio luego de 6 horas, y se colectó el sobrenadante 48 horas después. El mismo contenía las partículas virales en suspensión, que fueron filtradas con filtros de jeringa de 0,22 µm de tamaño de poro. Dichos sobrenadantes fueron utilizados inmediatamente o guardados a -80°C hasta su uso.

Infección de líneas celulares y posterior selección

La transducción de los plásmidos de interés se realizó mediante incubación durante 24 horas de las células blanco con el sobrenadante que contenía partículas virales. Luego de este tiempo se renovó el medio y agregó DMEM suplementado. El agente de selección se incorporó luego de 24 horas.

Purificación de Cdt2 sobre-expresado y espectrometría de masa en tándem

La identificación de nuevos sustratos de CRL4^{Cdt2} se llevó a cabo mediante la purificación por afinidad en tándem de Cdt2 sobre-expresado. A este fin, se expresó en forma transitoria una construcción Cdt2-FLAG-HA en las células HEK293T. Luego, se procedió a inmunoprecipitar la proteína con una matriz anti-FLAG y posteriormente, utilizando un péptido FLAG, se la separó de la matriz junto con las proteínas co-purificadas. Finalmente, se realizó una segunda inmunoprecipitación con un anti-HA. La degradación de los sustratos conocidos de CRL4^{Cdt2} requiere la asociación de Cdt2 y sus sustratos con la cromatina. Por lo tanto, las purificaciones antes mencionadas se llevaron a cabo a partir de extractos cromatínicos que se obtuvieron siguiendo protocolos de fraccionamiento celular previamente establecidos (**Figura 11**) (127). La tinción de plata de los geles de acrilamida se realizó con los reactivos de *SilverQuest™* de *Thermo Fisher Scientific*, según instrucciones del proveedor. El material obtenido a partir de este procedimiento se analizó, mediante espectrometría de masas, en colaboración con el grupo del Dr. Michele Pagano del Centro Médico de la Universidad de Nueva York (New York, NY, EE. UU.) y el Grupo del Dr. Laurence Florens del *Stowers Institute* (Kansas City, MO, EE. UU.).

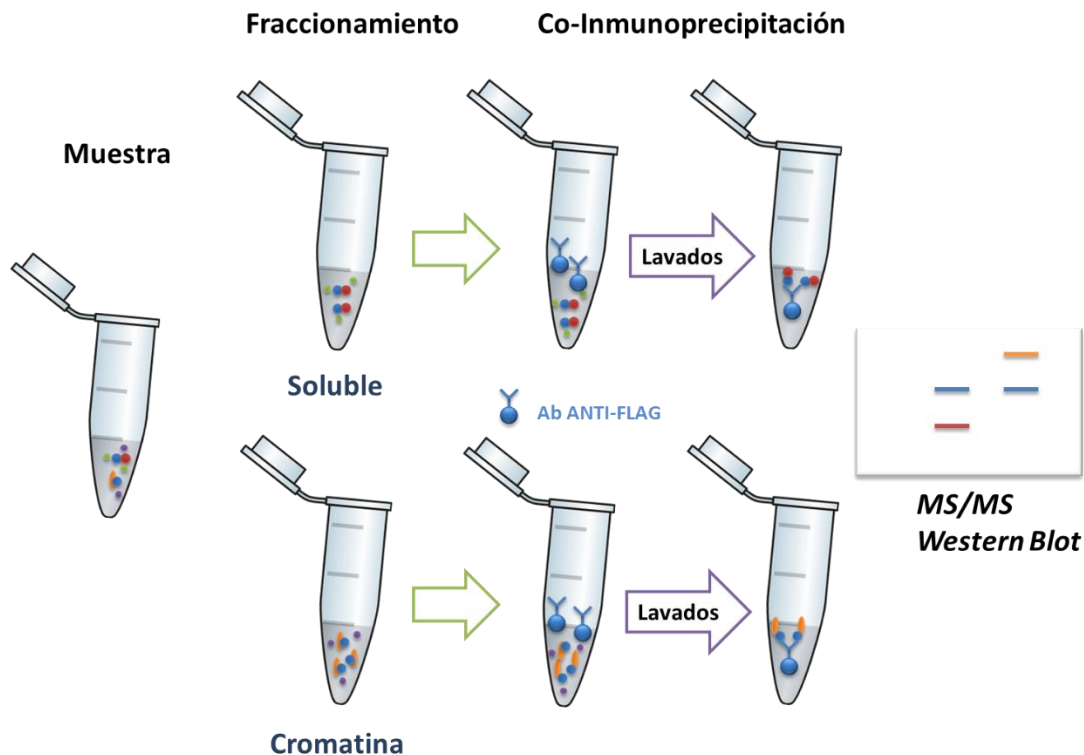


Figura 11. Representación esquemática del protocolo de fraccionamiento e inmunoprecipitación. Cada muestra fue separada en dos fracciones, soluble en buffer CSK (S) y cromatínica (C). La inmunoprecipitación se realizó en ambas fracciones. Posteriormente las purificaciones fueron analizadas por espectrometría de masa en tándem, o bien se realizaron *Western Blot* de las inmunoprecipitaciones.

A partir de la información obtenida se aplicó un enfoque multifactorial para identificar los candidatos más prometedores sobre los que focalizamos nuestra atención. El mismo ya ha sido utilizado en el pasado con éxito.

Western Blot

Preparación de los extractos celulares

Las muestras fueron colectadas luego de la incubación con Tripsina 1X y congeladas a -80° para su posterior lisis. De cada muestra se realizó un fraccionamiento celular mediante el uso de dos *buffers*, por un lado, obtuvimos una fracción soluble en buffer CSK (que comprende citoplasma y nucleoplasma) y por el otro lado la fracción cromatínica en un buffer 250mM de cloruro de sodio con Benzonasa Nucleasa (1:1000 Sigma). Ambos buffers fueron complementados con DTT (1mM), NaOV (1mM), Ácido Ocadeíco (0,5uM), Inhibidor de proteasas (1:50).

CSK

Pipes pH 7.4 o Hepes	10mM
NaCl	100mM
Sucrosa	300mM
MgCl ₂	3mM
TritonX100	0.7%

250mM NaCl-Lysis buffer

Tris pH7.4	50mM
NaCl	250mM
NaF	25mM
EDTA	2mM
TritonX	0.1%
MgCl ₂	3mM

Las muestras fueron cuantificadas con *Pierce BCA Protein Assay Kit*, según especificaciones de Thermo Fisher Scientific, y posteriormente lisadas en Laemmli *buffer* 4X (200 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% m/v SDS, 40% v/v Glicerol, 4% v/v β -mercaptoetanol, 50 mM EDTA, 0.08% m/v Azul de Bromofenol). Los lisados fueron calentados a 95°C por 5 minutos antes de sembrarlos en geles de poliacrilamida.

Inmunoprecipitación de proteínas sobre-expresadas

Para las inmunoprecipitaciones se realizó el fraccionamiento de preparación de muestras comentado en la sección anterior y se procedió con la incubación de las muestras con la resina de agarosa sin anticuerpo durante 30 min para eliminar el pegado inespecífico. Luego se separó el 10% de cada muestra, y se agregó Laemmli *buffer* 2X. La inmunoprecipitación se realizó con las perlas anti-FLAG M2 (Sigma), se incubó durante 2hs a 4°C, posteriormente se descartó el sobrenadante y se lavaron las perlas con el *buffer* 3 veces. Se agregó 50 μ l de Cracking Buffer 1X y se colocó a 95°C unos minutos.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), electrotransferencia y revelado

Las muestras fueron resueltas en geles de poliacrilamida 8-12% desnaturalizantes en *buffer* Tris-Glicina-SDS (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, 0,1% SDS). Para la identificación de los tamaños moleculares, se utilizó el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards* (BioRad). Se realizó la corrida electroforética hasta que cayó el frente de corrida. Una vez finalizada, en general se realizó la transferencia a membranas de PVDF de 0,45 µm de poro a 100 V durante una hora y media en *buffer* de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, 20% metanol). Luego, se tiñeron transitoriamente las membranas con rojo *Ponceau* para corroborar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana y comparar cualitativamente las masas sembradas en cada calle. Se incubaron las membranas durante 1 hora en agitación con solución de bloqueo TBS-Tween 0,05% (Tris 25 mM pH7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%) con 5% m/v de leche descremada para bloquear el pegado inespecífico.

La incubación con los anticuerpos primarios se llevó a cabo durante la noche a 4°C en agitación. Las diluciones de los anticuerpos fueron preparadas en BSA 3% en PBS-Tween 0,1%.

Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo:

- anti-c-Myc (A190-105A, *Bethyl Laboratories*)
- anti-FLAG (F7425, *Sigma-Aldrich*)
- anti-Cdt2 (NB100-40840, *Novus Biologicals*)
- anti-G9a (C6H3, *Cell Signaling*)
- anti-GLP (AB134768, *Abcam*)
- anti-ZNF644 (A303-276A-M, *Bethyl Laboratories*)
- anti-WIZ (PA5-21082, *Thermo Fisher Scientific*)
- anti-β-actina (sc-47778, *Santa Cruz Biotechnology*)
- anti-GAPDH (6C5, ab8245, *Abcam*)
- anti-H3 (*Abcam*)
- anti-p21 (*Bethyl Laboratories*)
- anti-PCNA (*Santa Cruz Biotechnology*)
- anti-Ciclina E (*Santa Cruz Biotechnology*)
- anti-GFP (*Santa Cruz Biotechnology*)

- anti-DDB1 (*Bethyl Laboratories*)
- anti-Rbx1 (*Novus Biologicals*)
- anti-pS15-P53 (*Cell Signaling*)
- anti-RPA (*EMD Millipore*)
- anti-Rad51 (*Sigma-Aldrich*)
- anti-Mre11 (*Abcam*)
- anti- γ H2AX (*EMD Millipore*)
- anti-Cul4 (*EMD Millipore*)
- anti-Cul2 (*Novus Biologicals*)
- anti-Cul7 (*Novus Biologicals*)
- anti-Cul9 (*Novus Biologicals*)
- anti-Tubulina (*Sigma*)

Las membranas fueron lavadas tres veces durante 5 min con TBS-Tween 0,1%. Luego, según el tipo de revelado elegido:

- Para revelar por quimioluminiscencia, se incubó con el anticuerpo secundario de la especie apropiada acoplado a peroxidasa de rabanito (HRP) (*Amersham, GE Healthcare*) en una dilución 1:5000 en solución de bloqueo por 1 h a RT en agitación. Luego de tres lavados de 5 min con TBS-Tween 0,1% y un cuarto lavado con TBS, la unión de los anticuerpos fue detectada con el kit de quimioluminiscencia *SuperSignal West Femto y West Pico* (*Pierce*).

- Para revelar por fluorescencia, se incubó con el anticuerpo secundario de la especie apropiada acoplado a los fluoróforos IRDye700DX o IRDye800CW (*LiCor Biosystems*) en una dilución 1:5000-1:10000 en solución de bloqueo por 1 h a RT en agitación. Luego de tres lavados de 5 min con TBS-Tween 0,1% y un cuarto lavado con TBS, la unión de los anticuerpos fue detectada con el equipo *Odyssey Fc Imaging System* (*Li-Cor Biosystems*).

Las señales inmunoreactivas fueron analizadas de forma digital utilizando el programa *ImageJ* (NIH).

Mutagénesis dirigida

Para poder realizar la identificación de la región de interacción de G9a con Cdt2 fue necesario generar construcciones mutantes con codones de stop prematuro. Para realizarlos utilizamos la técnica de mutagénesis sitio dirigido, que consiste en un PCR con dos cebadores que contienen la mutación puntual que se quiere introducir y la misma se

encuentra flanqueada por una secuencia que es complementaria a la cadena de ADN original. Es importante aclarar que la Taq polimerasa utilizada para este tipo de reacciones tiene que tener alta procesividad. En nuestro caso utilizamos Taq polimerasa Pfu (Agilent) y Taq KAPA HiFi (*Biosystems*), ambas según especificaciones del proveedor. Una vez finalizada la PCR el plásmido original fue digerido con la enzima *DpnI*, que corta en la secuencia GATC sólo si está metilada (**Figura 12**).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para un volumen final de 25 µl se realizó con los siguientes reactivos: 5 µl de 5X *KAPAHiFi™ Fidelity Buffer*, 1 µl de DMSO, 1 µl dNTPs (100mM), 0,5 µl Cebadores (100 µM), 100 ng de ADN, 1 µl *Taq KAPAHiFi™*, completar con agua desionizada hasta volumen final. La PCR se realizó con una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguida por 18 ciclos de una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, apareamiento a 55°C por 15 segundos, y la extensión a 72°C por 30seg por cada Kilobase de la construcción; por último, se realizó una extensión final a 72°C por 5 min. Luego se realizó la digestión con la enzima *DpnI*, que digiere el ADN parental que se encuentra metilado. El producto de PCR fue purificado con *QIAquick PCR Purification Kit* según especificaciones de *Qiagen*. La transformación de bacterias se realizó como se detalló previamente. Diferentes colonias fueron amplificadas, se extrajo el ADN plasmídico, y las diferentes muestras fueron secuenciadas para determinar se poseían la mutación.

Los cebadores que se utilizaron para realizar las mutagénesis y para secuenciar los plásmidos se encuentran detallados en Anexos.

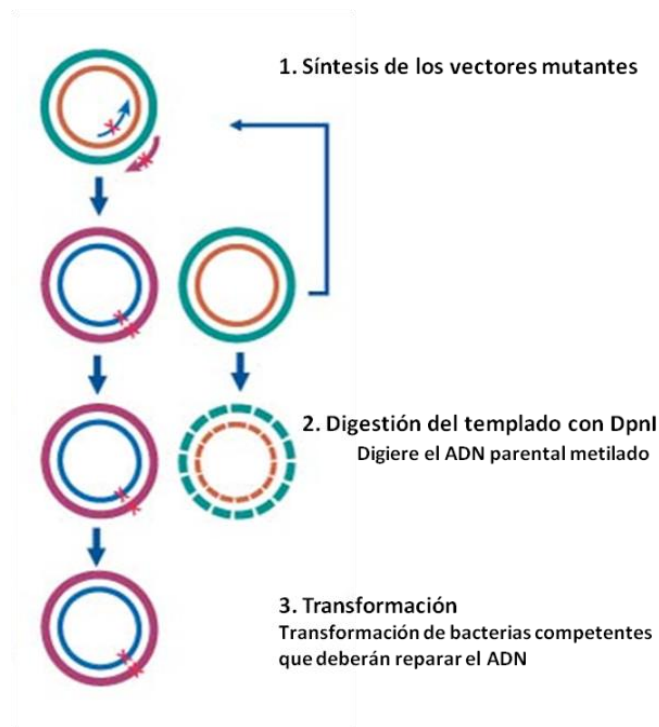


Figura 12. Mutagénesis Sitio Dirigida. Se realizó una PCR con dos cebadores que contienen la mutación puntual que se quiere introducir, la misma se encuentra flanqueada por una secuencia que es complementaria a la cadena de ADN original. Una vez finalizada la PCR el plásmido original fue digerido con la enzima DpnI, que corta en la secuencia GATC sólo si está metilada.

TR-TUBE

El análisis de la ubiquitinación se realizó mediante la técnica de TR-TUBE (*trypsin-resistant/tandem ubiquitin-binding entity(ies)*). Esta metodología es sumamente eficiente para la identificación de sustratos de E3 ligasas debido a que protege las cadenas de poliubiquitina estabilizando los sustratos. Se expresó en forma transitoria por 48 horas una construcción FLAG-TR-TUBE en las células HEK293T, en combinación con vectores que sobre expresan Myc-Cdt2-WT o su mutante Myc-Cdt2-R246A incapaz de ubiquitinar sus sustratos. Como control de dicho experimento también se tranfectó una construcción FLAG-TR-TUBE mutante, que es ineficiente en el pegado a las cadenas de ubiquitina. Antes de la colección de las muestras, todos los tratamientos fueron incubados durante 3 horas con MG132 5uM. Las muestras fueron lisadas con el buffer 250 mM NaCl, descrito previamente. Luego, se procedió a inmunoprecipitar FLAG-TR-TUBE con una matriz anti-FLAG durante 2 horas a 4°C y posteriormente se realizaron 3 lavados con el buffer de lisis centrifugando a 1200g entre cada lavado 1 minuto a 4°C. Por último, se retiró la totalidad del buffer de lavado, y las perlitas se resuspendieron en *cracking buffer* 2X.

Determinación de la vida media

Los ensayos de vida media, con ARNi o con la línea celular que expresa Cdt2 de manera Doxiciclina-dependiente, se realizaron tratando las células con Cicloheximida (Sigma) 100 µg/ml durante determinados periodos de tiempo.

Sincronización

CRL4Cdt2 cumple un rol fundamental durante el ciclo celular, por lo que realizamos experimentos sincronizando las células mediante distintos métodos:

Sincronización con *Nocodazole*

Se sembraron las células y se les agregó el *Nocodazole* (0,5 µg/ml) a las 6 hs. A las 18 o 20 hs se golpearon las placas para despegar las células que se encontraban en división, y suavemente se lavó con el medio que tenía la placa para juntar las células despegadas. Se centrifugaron las células y se lavó dos veces con medio fresco. Luego de esto las células se volvieron a sembrar para colectar las células a los tiempos determinados.

Doble bloqueo con Timidina

La sincronización se lleva a cabo según el siguiente esquema:

Día 1: Se trató con Timidina 2mM.

Día 2: A las 20 hs se lavó 2 veces con PBS 1X y se agregó medio fresco. Ese mismo día, 11 hs después se trató con Timidina 2mM.

Día 3: A las 14 hs se lavó con PBS 1X y se colocó medio fresco. A las células sincronizadas en G1/S, se las deja proseguir con el ciclo celular.

Para el análisis de ciclo celular por citometría de flujo, se fijaron las células agregando de a gotas etanol 70% frío. Se mantuvieron las muestras a -20°C hasta el marcado. Para el marcado del contenido de DNA las células se lavaron con PBS y se incubaron con una solución de ioduro de propidio (50 µg/ml ioduro de propidio y 50 µg/ml

RNAse A) durante 30 min a 4°C. Se analizaron las muestras mediante citometría de flujo (FACSCANTO II, BD Biosciences).

Tratamientos de agentes genotóxicos

Los tratamientos con distintas drogas se realizaron como se indica a continuación:

UV: 1500uJ/cm²

Hidroxiurea: 2mM por 16 hs

CPT: 1uM (tiempos indicados en lo experimento)

VP16: 50uM (tiempos indicados en el experimento)

Afidilcolina: 2ug/ml por 16 hs

Inmunofluorescencia

Se plaquero las células sobre los vidrios y al día siguiente se realizó el tratamiento correspondiente. Luego de esto las células fueron fijadas con metanol o PFA (paraformaldehído) durante 15 minutos. Se bloquearon las muestras con PBS 1X 3%BSA 0,5% Triton por 30 min, y luego se incubaron con el anticuerpo primario 2 hs a temperatura ambiente o 16 hs a 4°C. Se realizaron lavados con PBS 1X 0,1% Tween y se incubaron con el anticuerpo secundario 1hs a temperatura ambiente en oscuridad. Se realizó un lavado, se incubó con DAPI durante 5 minutos en la oscuridad, se lavó nuevamente y se procedió con el montaje de estos.

Generación de líneas *Knockout* por el sistema CRISPR/Cas9

Para la generación de las líneas *knockout* de G9a y GLP utilizamos dos líneas celulares, Hek293T y U2OS. En el caso de las Hek293T debido a su alta eficiencia de transfección, se realizaron 5 transfecciones consecutivas con la construcción de expresión pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458), que contiene una endonucleasa etiquetada con GFP y las secuencias guía descritas más adelante. Las células fueron luego separadas por fluorescencia (FACS, *Fluorescence-activated cell sorting, applied in flow cytometry*) y

cultivadas de a una célula hasta que formaron una colonia. Las mismas fueron luego analizadas mediante *Western Blot*, y posteriormente, se realizó la extracción de ADN genómico de los clones que no expresaban la proteína, se amplificó la región diana de las secuencias guía y se secuenciaron para evaluar la generación de mutaciones en dichos amplicones (**Figura 13**). En el caso de la línea celular U2OS, se realizaron cinco rondas de transfección y purificación por separación celular por fluorescencia, ya que la eficiencia de transfección fue muy baja. Las secuencias guías y los cebadores que se utilizaron para realizar las construcciones se encuentran disponibles en anexos.

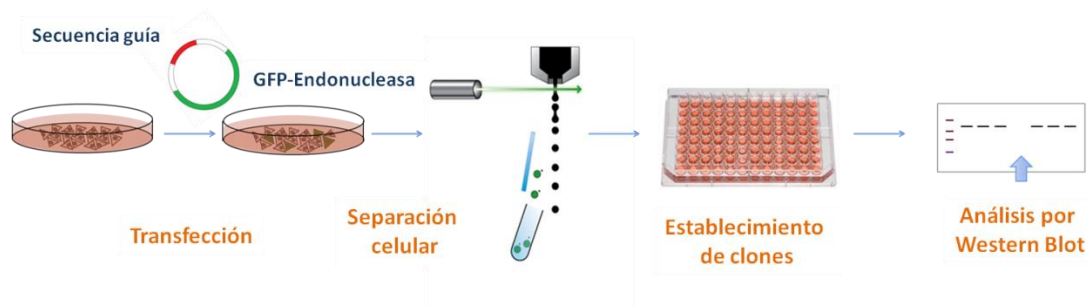


Figura 13. Representación del protocolo para el establecimiento de líneas Knockout por CRISPR/Cas9. Se realizó la transfección de la construcción de expresión pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458), que contiene una endonucleasa etiquetada con GFP y las secuencias guía. Las células fueron luego separadas por FACS y cultivadas. Los clones fueron analizados mediante *Western Blot*.

Análisis de modificaciones post-traduccionales de Cdt2

Para identificación de modificaciones postraduccionales en Cdt2 se expresó en forma transitoria una construcción Cdt2-FLAG-HA en las células Hek293T, en las células G9a-KO y GLP-KO. Luego, se realizó la lisis de las muestras con un buffer con alta concentración de SDS (Tris-HCl pH 6.8 50 mM, SDS 2% (w/v), Glicerol 10% (v/v), EDTA 12.5 mM) y fueron sonicadas. Las muestras se diluyeron en PBS, para diluir el SDS y se procedió a inmunoprecipitar la proteína con una matriz anti-FLAG y posteriormente, utilizando un péptido FLAG, a eluirla. El material obtenido a partir de este procedimiento se analizó, mediante espectrometría de masas, en colaboración con el grupo del Dr. Michele Pagano del Centro Médico de la Universidad de Nueva York (New York, NY, EE. UU.).

Daño al ADN inducido por láser y “Live Imaging”

Las transfecciones con ARNi se realizaron 30 horas antes de la microscopía. 5 horas después se sembraron 50.000 células por pocillo en una placa de 4 pocillos de borosilicato de fondo de cubreobjetos (*Lab-Tek II*). Las células se pre-sensibilizaron con 10 μ M de BrdU (Merck) durante 24 horas. Para la obtención de imágenes, el día de la recolección de datos, las células se incubaron en *FluoroBrite™ DMEM* suplementado con 10% de suero fetal bobino, 25 mM de HEPES y piruvato de sodio. Las imágenes se realizaron utilizando un sistema de microscopio invertido *DeltaVision Elite*, utilizando un objetivo de aceite de 60 \times (apertura numérica 1,42) de Olympus. La excitación se logró con un sistema de iluminación de estado sólido (*7 Color Combined Insight*), equipado con un divisor de haz policrónico con juegos de filtros para admitir GFP (excitación: 475/28nm, emisión: 525/50nm) y *mCherry* (excitación: 575/25nm, emisión: 632/60nm). Las imágenes se adquirieron usando una cámara *CoolSNAP HQ2*. Se generó el daño en el ADN usando un láser de 405 nm, 50 mW a 100% de potencia durante 0,5 segundos. Se grabaron dos imágenes pre-láser, y luego se tomaron 44 imágenes cada 15 segundos cada una.

La intensidad de reclutamiento se analizó usando una macro escrita para *ImageJ* (*measure spot through time macros v101*) que calculó la relación de intensidad de la región de incidencia del láser definida A, sobre otra área del núcleo B, después de restar la intensidad de fondo de un área sin células de la imagen, C. Por lo tanto, la unidad de fluorescencia relativa (RFU) para cada punto se calculó mediante la ecuación $RFU = (A-C)/(B-C)$.

RESULTADOS

Purificación y selección de interactores de CRL4^{Cdt2}

Purificación de proteínas que interactúan con Cdt2

Como se mencionó anteriormente la formación y progresión de tumores está regulada en última instancia por la abundancia y la actividad de factores proteicos oncogénicos o supresores tumorales. En este sentido, debido al rol que cumple la cascada de ubiquitinación en el control de la homeostasis proteica, es de esperar entonces que el estudio a nivel molecular junto con el desarrollo de compuestos que modulan componentes específicos de la vía de ubiquitinación, pueda facilitar el desarrollo y mejoramiento de tratamientos dirigidos a distintos tipos de cáncer (35). En particular, el grupo de E3 ligasas representa un excelente candidato a nivel terapéutico debido a que estas enzimas son las responsables de regular en forma directa la especificidad de esta compleja red enzimática (128).

Distintas líneas de investigación de grupos independientes han demostrado que la E3 ligasa CRL4^{Cdt2} desempeña un rol fundamental en la regulación de la replicación y reparación del ADN, en condiciones normales como así también en respuesta al daño al ADN. En concordancia con estos resultados, se ha demostrado que alteraciones en los niveles de distintos componentes de CRL4^{Cdt2} están asociadas a la aparición y progresión de procesos tumorigénicos, destacando su alto potencial como posible punto de intervención terapéutica en cáncer (93-97, 129).

En base a las evidencias reportadas y con el fin de contribuir a dilucidar a nivel molecular como la desregulación de la actividad de esta E3 ligasa contribuye al desarrollo de procesos oncogénicos, se procedió a la identificación de posibles nuevos sustratos de CRL4^{Cdt2}. A este fin se realizaron distintas purificaciones por afinidad en tándem de Cdt2 sobre-expresado que fueron posteriormente analizadas mediante espectrometría de masa en tándem. Considerado el rol importante que CRL4^{Cdt2} cumple en condiciones de estrés genotóxico, las purificaciones se realizaron tanto en condiciones normales como así también en presencia de agentes causantes de daño al ADN (Hidroxiurea, Camptotecina y radiación UVC). Como se ha indicado anteriormente, es de esperar que la interacción entre CRL4^{Cdt2} y sus sustratos promueva la degradación proteosomal de los mismos. Por lo tanto, con el

objeto de aumentar las posibilidades de detectar posibles sustratos de CRL4^{Cdt2}, las purificaciones se realizaron en presencia de un inhibidor de proteosoma (MG132) y un inhibidor indirecto (MLN4924) de todas las CRLs.

El primer control que realizamos luego del proceso de purificación consistió en corroborar si se detectaba la interacción de Cdt2 con los restantes componentes del complejo CRL4 (Cul4, DDB1 and RBX1). Tal como se observa en la **Figura 14A**, la co-inmunoprecipitación de todos los componentes que forman parte de esta E3 ligasa indica que, en nuestras condiciones experimentales, pudimos purificar Cdt2 como parte del complejo activo CRL4^{Cdt2}. Asimismo, la ausencia en nuestras purificaciones de cullinas que no forman parte del complejo CRL4, como la Cullina 2, la 7 y la 9, demuestra la especificidad de nuestros experimentos.

En muchos casos la interacción de las E3 ligasas CRLs con sus sustratos está regulada por modificaciones post-traduccionales. En el caso de CRL4^{Cdt2}, la degradación de la mayoría de los sustratos conocidos requiere la asociación de esta E3 ligasa y sus sustratos con la cromatina. En base a estas observaciones, las purificaciones antes mencionadas se llevaron a cabo a partir de extractos cromatínicos obtenidos siguiendo protocolos de fraccionamiento celular largamente establecidos (127). Como puede observarse en la **Figura 14B** las purificaciones de las muestras en las cuales se sobre-expresó Cdt2 mostraron un patrón de bandas en la tinción de plata de la inmunoprecipitación completamente diferente de aquellas que procedieron de células que fueron transfectadas con un vector vacío. Esto es indicativo de que el método de inmunoprecipitación utilizado permitió el enriquecimiento específico de interactores de Cdt2. El material obtenido a partir de este procedimiento se analizó, mediante espectrometría de masas, en colaboración con el grupo del Dr. Michele Pagano del Centro Médico de la Universidad de Nueva York (New York, NY, EE. UU.) y el Grupo del Dr. Laurence Florens del *Stowers Institute* (Kansas City, MO, EE. UU.).

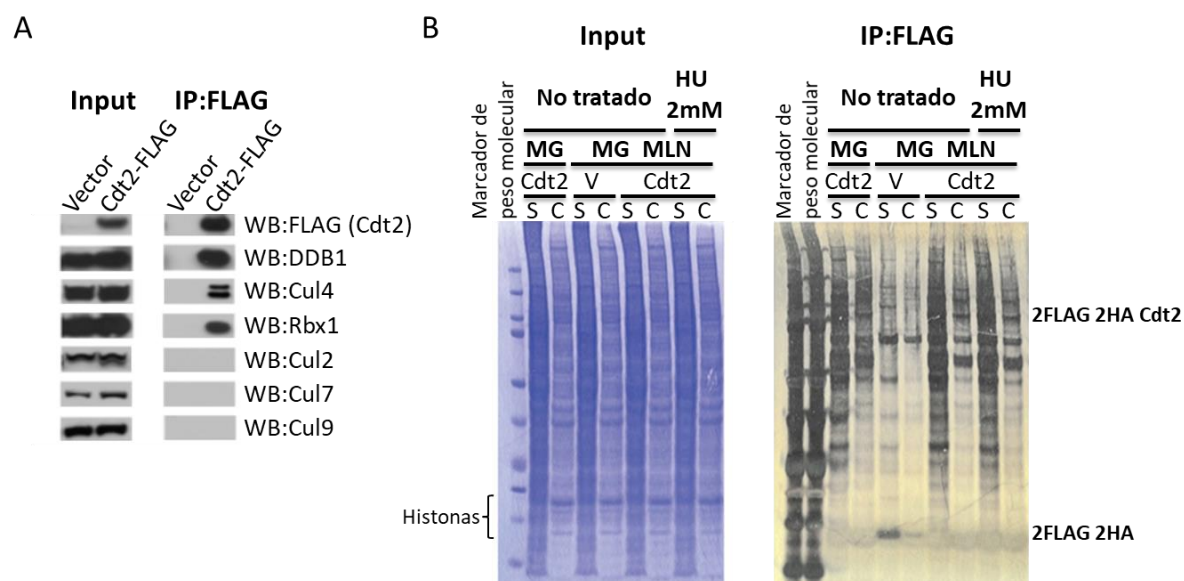


Figura 14. Purificación de Cdt2. (A) Interacción de Cdt2 con los componentes del complejo CRL4 (Cul4, DDB1 and RBX1), Input: lisados celulares, IP: inmunoprecipitación. (B) Input (tinción con *Coomassie*) e Inmunoprecipitación (tinción de Plata) de Cdt2 sobre-expresado. Las células Hek293T fueron transfectadas con una construcción que expresa Cdt2-FLAG-HA (Cdt2) o un vector vacío (V). Las muestras fueron tratadas con agentes causantes de daño al ADN (Hidroxiurea, Camptotecina y radiación UVC), inhibidor de proteosoma (MG132) e inhibidor indirecto de cullinas (MLN4924) en distintas combinaciones. Las muestras fueron separadas en dos fracciones, soluble en el *buffer* CSK (S) y cromatina (C). La inmunoprecipitación (IP:FLAG) se realizó en ambas fracciones. Los *Western Blot* se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas o etiquetas (*tag*) detalladas en la imagen.

Identificación de los candidatos más prometedores a través de un enfoque multifactorial integrador

Con el objetivo de identificar los candidatos más prometedores sobre los cuales focalizar nuestra atención, los interactores obtenidos de las purificaciones sobre la cromatina se ordenaron teniendo en cuenta la frecuencia relativa de aparición de los péptidos detectados en las distintas condiciones (**Tabla 3**). Cuando se realizó el análisis de los primeros interactores, no se observaron diferencias significativas entre las distintas purificaciones de Cdt2 realizadas.

Cuando se procedió con el análisis detallado de los interactores candidatos de Cdt2 se evidenció que los 4 primeros genes del orden de mérito generado, PRPF4B, KIAA1429, SAFB y NHP2 codificaban para proteínas involucradas en el procesamiento del ARN (130-133). Cdt2 contiene en su estructura dominios de repetición WD40, cuya función es servir como una plataforma rígida para las interacciones proteína-proteína, pero también se ha

demostrado que estos dominios se unen a estructuras de ARN (134). En este sentido, las proteínas codificadas por estos genes junto con moléculas de ARN se pueden haber asociado de modo no específico a los dominios WD40 de Cdt2, como resultado de su sobre-expresión. Por lo tanto, los primeros candidatos fueron descartados considerando que la posibilidad de una que se hubieran purificado junto a Cdt2 en forma indirecta. Focalizamos nuestra atención entonces en Ehmt1, que era el siguiente gen en la lista. Ehmt1 codifica para una proteína nuclear denominada GLP. GLP es una metiltransferasa de histonas que *in vivo*, forma un heterodímero con G9a. Ehmt2, gen que codifica para la proteína G9a, también estaba presente entre los primeros 12 posibles candidatos, indicando que Cdt2 era capaz de asociarse al complejo activo que forman G9a/GLP. Por lo tanto, esto nos inducía a pensar que existía una relación funcional entre ambos complejos.

Tabla 3. Interactores de Cdt2 en la fracción cromatínica. El material obtenido de la purificación de Cdt2 se analizó mediante espectrometría de masa en tándem. Los interactores obtenidos de las purificaciones sobre la cromatina se ordenaron teniendo en cuenta la frecuencia relativa de aparición de los péptidos detectados en las distintas condiciones. En celeste se señalan los genes seleccionados, GLP (EHMT1) y G9a (EHMT2). En gris se señalan los genes descartados.

Gen	CDT2-MG- MLN-C1	CDT2-MG- MLN-C2	CDT2-MG- MLN-C3	CDT2-MG- C2	CDT2-MG- C3	CDT2-MG- UV-C2	CDT2-MG- MLN-UV-C2	CDT2-MG- MLN-HU- Chr3	CDT2-MG- CPT-C4
PRPF4B	2	2	6	13	15	4	7		3
KIAA1429		2	3	7	12	8	6		1
SAFB	3	3	5	8		4	3		7
NHP2				4	2	4	4		3
EHMT1		1	5	5	2	2	1		
WIZ	2	1	2	1	7			1	1
ZNF644	6				4	2	1		
SENP3	2	2	3		4				
ZC3H13			2	2	3	3			
MAGOH			2	4	1				3
KDM5B			2		7				
EHMT2	1			3	3	1			
MDC1			3		2				3
KIAA1671	4	1	1				1		
YY1AP1			2	2	3				
KIFC1			2		5				
WDR3	4		1		1				
RAD54L2					6				
ZBTB39			2		4				
MCM2	4		1						

La modificación post-traducciona de las histonas afecta la estructura de la cromatina y participa en la regulación de la transcripción génica. El complejo formado por G9a y GLP es responsable de mono- y dimetilar la histona 3 en la lisina 9. Este marcador epigenético está relacionado con el silenciamiento transcripcional. En los últimos años se les han atribuido a

G9a y GLP papeles centrales en procesos relacionados con la diferenciación celular, el control de la progresión del ciclo celular y la reparación del daño al ADN (135). La desregulación de cualquier factor clave que regula estos procesos celulares puede afectar la homeostasis de las células, favoreciendo la transformación maligna celular. Por lo tanto, no es sorprendente que se haya encontrado una correlación entre la aparición de alteración en la actividad de este complejo epigenético y el desarrollo de procesos carcinogénicos.

Es importante recordar que entre los sustratos de CRL4^{Cdt2} se encuentran otras proteínas encargadas de la remodelación y reorganización de la cromatina, como Set8, TGD y MMSET (72, 74, 77-79). Si bien aún no está claro las implicancias que tiene la regulación de estos sustratos por parte de CRL4^{Cdt2}, nos resultó muy interesante la posibilidad de que esta E3 ligasa tuviese un rol central en la regulación de la transcripción y la diferenciación celular, controlando los niveles de distintos modificadores de histonas sobre la cromatina.

Por todo lo expuesto anteriormente, y teniendo en cuenta factores como la disponibilidad de anticuerpos, construcciones de sobre-expresión y ARN de interferencia, decidimos focalizar nuestra atención sobre G9a y GLP, como posibles interactores de Cdt2.

Validación de los interactores seleccionados

Cdt2 interactúa con G9a y GLP sólo en la fracción cromatínica

Si bien durante el proceso de identificación de nuevos sustratos de Cdt2 nos focalizamos exclusivamente en las purificaciones realizadas a partir de los componentes celulares asociados a la cromatina (fracción cromatínica), no podíamos descartar que Cdt2 interactuara también con G9a y GLP en el nucleoplasma o citoplasma (fracción soluble). A este fin, se procedió con la inmunoprecipitación de Cdt2 sobre-expresado en ambas fracciones. Como se observa en la **Figura 15**, nuestros resultados demuestran que Cdt2 co-inmunoprecipita con G9a y GLP endógenos sólo en la fracción cromatínica.

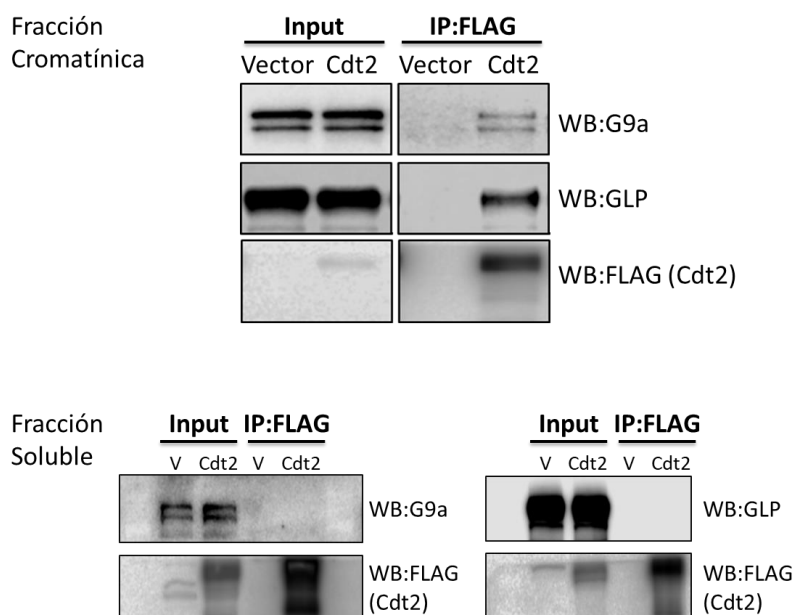


Figura 15. La interacción de Cdt2 con G9a y GLP ocurre sólo en la fracción cromatínica. Las células Hek293T fueron transfectadas con una construcción que expresa Cdt2-FLAG-HA (Cdt2) o un vector vacío (Vector). Las muestras fueron separadas en dos fracciones (Fracción Cromatínica y Fracción Soluble). La inmunoprecipitación (IP: FLAG) se realizó en ambas fracciones. Los *Western Blot* se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas detalladas en la imagen o el tag FLAG (Cdt2).

Es importante remarcar que, en todos los casos, las fracciones cromatínicas fueron tratadas con endonucleasa para digerir el ADN y separar los complejos proteicos que se encontraran asociados a la cromatina. Este tratamiento nos asegura que la interacción observada entre las proteínas estudiadas es directa, y que, en nuestro caso particular, la co-inmunoprecipitación de CRL4^{Cdt2} junto con G9a/GLP no ocurre porque ambos complejos se encuentran asociados al ADN en forma independiente.

Como se puede observar en el gel de la **Figura 14B**, Las histonas son los componentes proteicos más abundantes que contiene los lisados celulares totales de las purificaciones obtenidos a partir de la fracción cromatínica. Sin embargo, en la tinción de plata de las inmunoprecipitaciones de Cdt2 no se observan bandas en la región correspondiente al peso molecular de las histonas. Este detalle confirma que la co-inmunoprecipitación de G9a y GLP en las purificaciones de Cdt2 es directa y no se debe a una asociación indirecta a través de las histonas.

Identificación del *degron* de G9a

Así como un sustrato puede ser ubiquitinado por diferentes enzimas, una misma E3 ligasa generalmente regula la ubiquitinación de varios sustratos. Teniendo en cuenta las CRLs y los componentes que forman este complejo, una de las formas más utilizadas para estudiar la relevancia biológica de la interacción E3 ligasa-sustrato, consiste en disminuir los niveles proteicos de los receptores de sustrato del complejo (en nuestro caso Cdt2), mediante la implementación de ARN de interferencia. Esta estrategia afecta a todos los sustratos de dicha E3 ligasa, y por lo tanto, el fenotipo observado en estas condiciones experimentales será resultado de la alteración combinada de todos los sustratos de la E3 ligasa estudiada (**Figura 16A**). Sin embargo, existe otra forma más específica de estudiar las consecuencias biológicas de la interacción de una E3 ligasa con un sustrato determinado. La misma consiste en identificar primero la región de interacción en el sustrato, conocida como “*degron*”, y luego reemplazar los aminoácidos de esta región para generar un sustrato insensible a la regulación por la E3 ligasa. En una segunda instancia, en líneas que no expresen dichos sustratos proteicos (generadas utilizando la tecnología de ARN de interferencia o CRISPR), se expresan las versiones normales y mutantes en el *degron* del sustrato en estudio. El fenotipo observado en la condición que expresa la versión mutante del *degron*, será una consecuencia de la expresión de esta proteína, que es insensible a la regulación por la E3 ligasa (**Figura 16B**). El *degron*, generalmente, se encuentra representado por un pequeño tramo de unos pocos aminoácidos. Está ampliamente demostrado que mutaciones de pocos residuos en esta región inhiben la interacción del sustrato con la E3 ligasa.

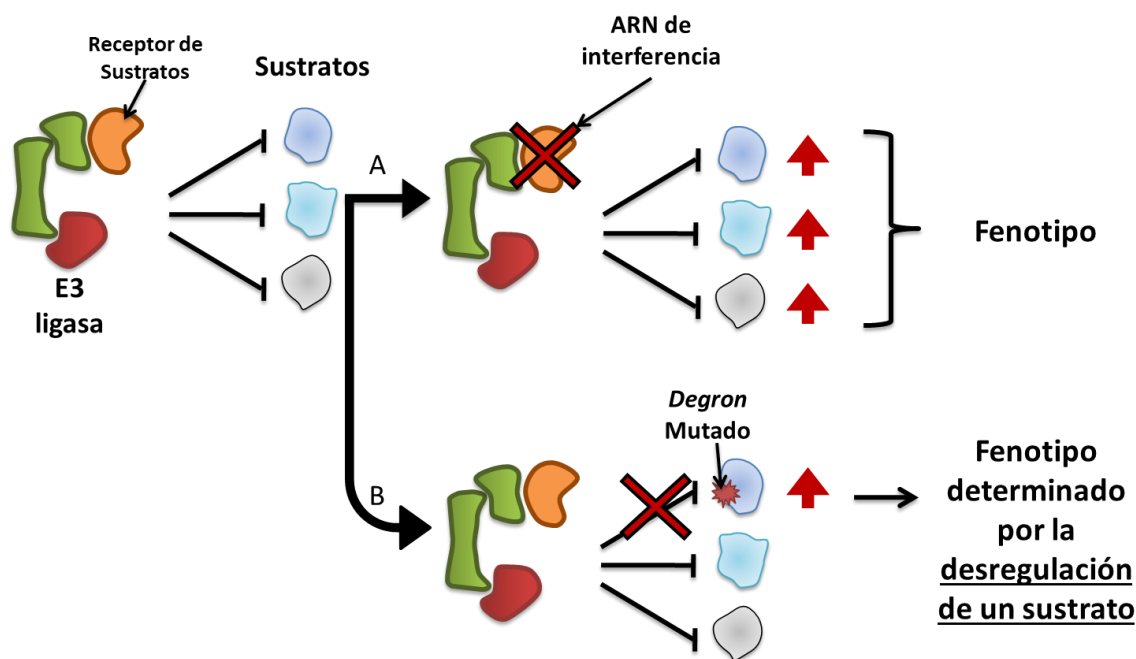


Figura 16. Estrategias para el estudio de la interacción E3 ligasas CRL-Sustrato. El estudio de la relevancia biológica de la interacción E3 ligasa CRL-sustrato puede realizarse: (A) disminuyendo los niveles proteicos de los receptores de sustrato del complejo (en nuestro caso Cdt2), mediante la implementación de ARN de interferencia. Esta estrategia afecta a todos los sustratos de la E3 ligasa y el fenotipo observado es resultado de la alteración combinada de todos los sustratos. (B) Otra forma más específica consiste en identificar primero la región de interacción en el sustrato (*degron*) y luego reemplazar estos aminoácidos para generar un sustrato insensible a la regulación por la E3 ligasa. Versiones normales y mutantes en el *degron* se expresan en líneas que no expresen el sustrato. El fenotipo observado en la condición que expresa la versión mutante del *degron*, será una consecuencia de la expresión de la proteína insensible a la regulación por la E3 ligasa.

Diversas publicaciones le atribuyen a G9a la capacidad catalítica del complejo de metiltransferasas (105). Teniendo esto en cuenta, decidimos en una primera instancia focalizarnos en la identificación del *degron* de G9a. Asimismo, debido a la alta homología de secuencia que existe entre G9a y GLP, esperábamos en una segunda instancia poder extrapolar fácilmente los resultados obtenidos del análisis del *degron* de G9a a GLP.

El grupo del Dr. Hara (*Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, Japan*) nos facilitó 4 construcciones de G9a, una de lectura completa y tres versiones mutantes de delección que contiene codones de *stop* prematuros (136). Como se observa en el esquema de la **Figura 17A** la construcción G9a-922, no contiene el dominio SET terminal; G9a-685, no contiene los dominios Anquirina y SET terminal; y la construcción G9a-425, que además no contiene el dominio Cisteína. Para realizar el mapeo de la región de interacción se transfectaron las construcciones de G9a o sus versiones mutantes en combinación con

Cdt2 o un vector vacío. Luego se realizó la inmunoprecipitación de G9a para evaluar cuales de los mutantes no interactuaba con Cdt2. Como puede observarse en la **Figura 17B**, sólo el mutante de delección G9a-425 no es capaz de co-inmunoprecipitar Cdt2. El mismo experimento se desarrolló usando Cdt2-GFP, y corroboramos que efectivamente sólo el mutante G9a-425 era incapaz de co-inmunoprecipitar Cdt2 (**Figura 17C**). A partir de estos resultados, se logró restringir la región de interacción entre los aminoácidos 425-685 (dominio rico en cisteínas).

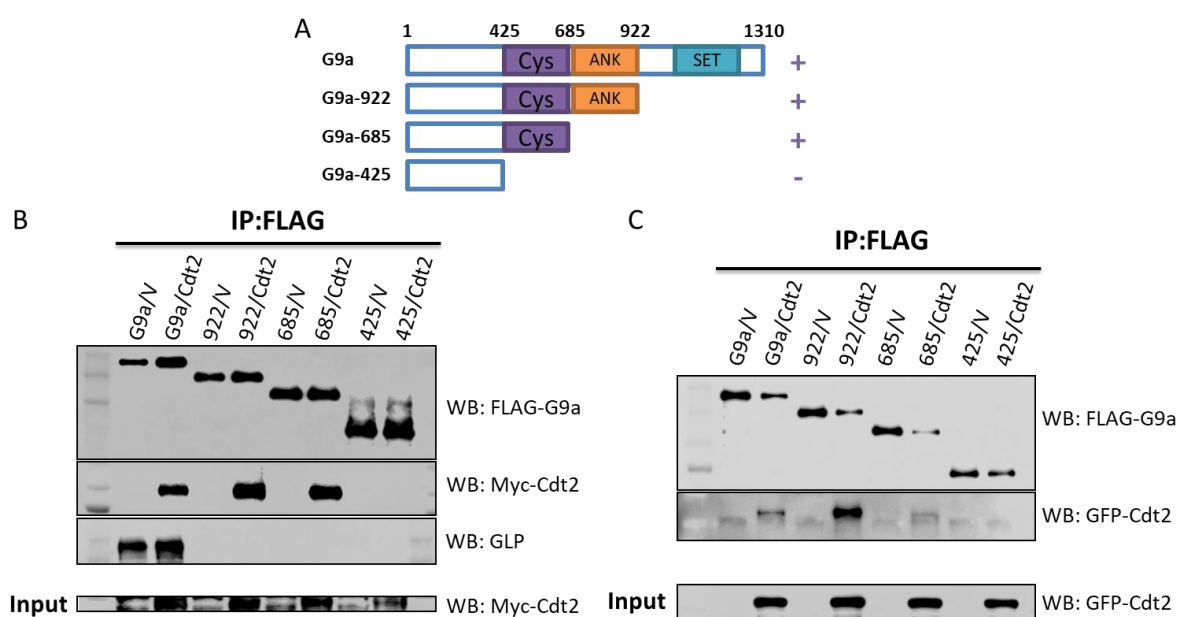


Figura 17. Identificación de la región de interacción de G9a con Cdt2. (A) Representación esquemática de los dominios que contienen las construcciones de G9a y sus mutantes de delección. (B) Las células Hek293T fueron transfectadas con una construcción que expresa Cdt2-Myc (Cdt2) o un vector vacío Myc (Vector) en combinación con las diferentes construcciones de G9a y sus mutantes. Se realizó la inmunoprecipitación (IP: FLAG) de G9a y sus mutantes de delección. Los *Western Blot* se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas detalladas en la imagen o los *tags* FLAG (G9a) y Myc (Cdt2). Se observa la co-inmunoprecipitación de G9a con GLP endógeno. Se observa la expresión de Myc en los *Input*. (C) Las células Hek293T fueron transfectadas con una construcción que expresa Cdt2-GFP (Cdt2) o un vector vacío GFP (Vector) en combinación con las diferentes construcciones de G9a y sus mutantes. Se realizó la inmunoprecipitación (IP: FLAG) de G9a y sus mutantes de delección. Los *Western Blot* se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas detalladas en la imagen o los *tags* FLAG (G9a) y GFP (Cdt2). Se observa la expresión de GFP en los lisados celulares.

G9a y GLP forman un complejo e interactúan a través de sus dominios SET. En concordancia con lo esperado, sólo la construcción de G9a que codifica para la proteína completa es capaz de interactuar y co-inmunoprecipitar GLP endógeno (**Figura 17B**, último panel).

A partir de estos resultados y para delimitar el *degron* dentro del dominio Cisteína de G9a, generamos nuevos mutantes de delección mediante la técnica de mutagénesis dirigida. Como puede observarse en la **Figura 18**, se realizaron inmunoprecipitaciones con varias construcciones que expresan mutantes de delección de G9a. Al igual que el mutante G9a-425, la construcción G9a-477 no lograba co-inmunoprecipitar Cdt2. Sin embargo, algunos mutantes de delección de G9a (G9a-510, G9a-529) recuperaban la interacción con Cdt2. Pero también, teníamos otros mutantes de delección que generaban proteínas más grandes y contenían la región que recuperaba la interacción, y que a pesar de esto no eran capaces de co-inmunoprecipitar con Cdt2 (G9a-563, G9a-581, G9a-633 y G9a-666). Con estos resultados se lograron restringir dos regiones importantes para la interacción, por un lado, entre el aminoácido 666 y el 681, y por el otro entre el 477 y 510, y se optó por continuar el mapeo en ambas regiones.

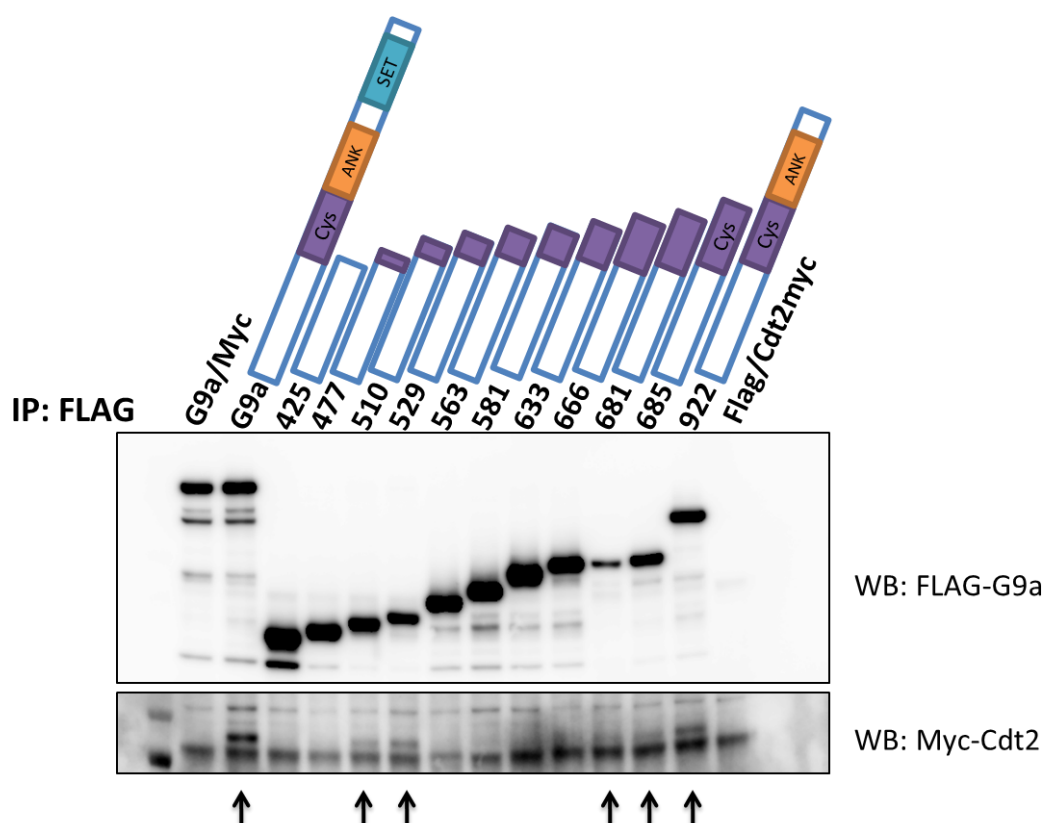


Figura 18. Identificación de la región de interacción de G9a con Cdt2 utilizando los mutantes de delección generados. Las células Hek293T fueron transfectadas con: una construcción que expresa G9a y un vector vacío Myc (calle indicada con G9a/Myc); o Cdt2myc (Cdt2) en combinación con las diferentes construcciones de G9a y sus mutantes de delección (se encuentran representados esquemáticamente); o con un vector vacío Flag y Cdt2myc (calle indicada con Flag/Cdt2myc). Se realizó la inmunoprecipitación (IP: FLAG) de G9a y sus mutantes de delección. Los *Western Blot* se revelaron con anticuerpos específicos contra los tags FLAG (G9a) y Myc (Cdt2). Se detalla con una flecha las calles en las que se detecta inmunoprecipitación.

Utilizando otros mutantes de delección generados para reducir al mínimo la región necesaria para la interacción, logramos definir dos *degron* en G9a, uno entre los aminoácidos 666-671 y otro entre 481-489.

El objetivo de mapear el *degron* en G9a tenía como fin reemplazar los aminoácidos de esta región para generar un sustrato insensible a la regulación por la E3 ligasa. Por este motivo, una vez que se lograron reducir las regiones de interacción, se realizó la sustitución por alaninas de los aminoácidos comprendidos en ambas regiones, en el contexto de una construcción que interactuaba con Cdt2.

En una primera instancia, estos mutantes de sustitución se generaron en la construcción G9a-681, un mutante de delección que es capaz de interactuar con Cdt2. Como puede observarse en la **Figura 19**, dos mutantes de sustitución no inmunoprecipitaban Cdt2, el *667_5A, que contiene 5 alaninas entre los residuos 667 y 671 inclusive, y el *667_2A que tiene dos alaninas en 667 y 668.

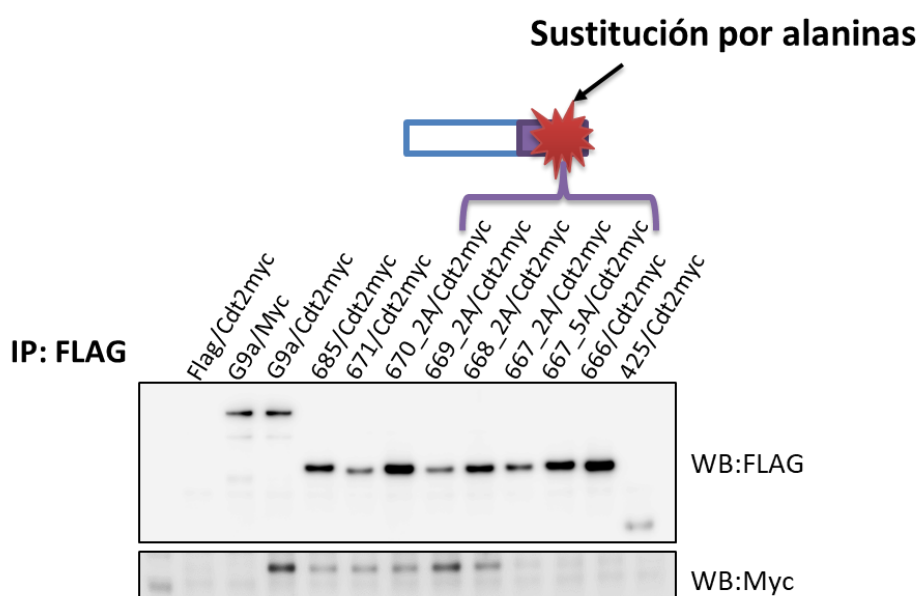


Figura 19. Identificación de la región de interacción de G9a con Cdt2 utilizando mutantes con sustituciones de alaninas en el vector G9a-681. Las células Hek293T fueron transfectadas con: una construcción que expresa un vector vacío Flag y Cdt2myc (Flag/Cdt2myc); o G9a y un vector vacío Myc (G9a/Myc); o Cdt2myc (Cdt2) en combinación con las diferentes construcciones de G9a y sus mutantes de delección o sus mutantes con sustituciones alanina en el contexto del mutante G9a-681. Se realizó la inmunoprecipitación (IP: FLAG) de G9a y sus mutantes. Los *Western Blot* se revelaron con anticuerpos específicos contra los *tags* FLAG (G9a) y Myc (Cdt2). Se marcan con una representación esquemática los mutantes que tienen alaninas sustituidas en la posible región de interacción (667-671) en la construcción G9a-681.

En una segunda instancia, los mutantes de sustitución se realizaron en la construcción que contenía G9a completa. Utilizando dichos plásmidos en experimentos de inmunoprecipitación se evidenció que todas las construcciones que tenían estas sustituciones en la proteína completa, co-inmunoprecipitaban con Cdt2 (**Figura 20**). Como el mutante G9a-681 no contiene el dominio SET necesario para la interacción con GLP, y en cambio, los mutantes de sustitución de G9a interactúan con GLP endógeno (último panel, **Figura 20**), se hipotetizó que la interacción entre G9a y Cdt2 podía ser tanto directa como indirecta, y esta última estaría mediada por GLP.

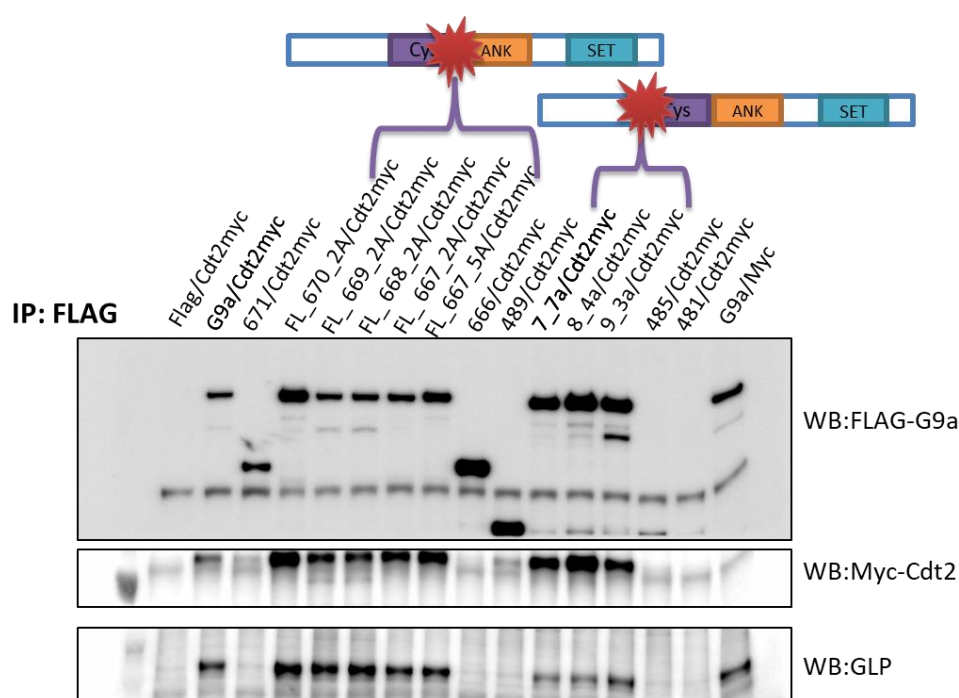


Figura 20. Identificación de la región de interacción de G9a con Cdt2 utilizando mutantes con sustituciones de alaninas. Las células Hek293T fueron transfectadas: con una construcción que expresa un vector vacío Flag y Cdt2myc (Flag/Cdt2myc); o Cdt2myc (Cdt2) en combinación con las diferentes construcciones de G9a o sus mutantes de delección o sus mutantes con sustituciones alanina en el contexto de la proteína completa; o G9a y un vector vacío Myc (G9a/Myc). Se realizó la inmunoprecipitación (IP: FLAG) de G9a y sus mutantes. Los Western Blot se revelaron con anticuerpos específicos contra la proteína GLP y los tags FLAG (G9a) y Myc (Cdt2). Se marcan en una representación esquemática los mutantes que tienen alaninas sustituidas en las posibles regiones de interacción en la proteína completa entre los aminoácidos 667-671 y 481-489. Se puede observar la interacción de G9a y sus mutantes con GLP endógeno.

Para determinar si GLP podía mediar la interacción entre G9a y Cdt2 se utilizaron dos enfoques experimentales distintos. Por un lado, la región de interacción entre G9a y GLP se encuentra delimitada a unos pocos aminoácidos en el dominio SET de ambas

proteínas(105). Utilizando esta información fue posible generar un mutante de G9a que no interactúa con GLP, y luego en esta construcción, se realizó la sustitución por alaninas de los residuos de las posibles regiones de interacción (**Figura 21**). Por otro lado, se realizó la inmunoprecipitación de G9a y de sus versiones mutantes en una línea celular derivada de la línea Hek293T que no expresa la proteína GLP (**Figura 22**). Esta línea celular fue generada mediante el sistema CRISPR/Cas9 (su generación y caracterización se detallará más adelante).

Se verificó que las construcciones generadas a partir del mutante de G9a que no interactúan con GLP, efectivamente no eran capaces de co-inmunoprecipitar GLP endógeno (G9a co-inmunoprecipita GLP endógeno, en cambio las construcciones de G9a que tienen una delección entre los aminoácidos 1112-1115 en el SET terminal, pierden la capacidad de interactuar con GLP; panel inferior de la **Figura 21**). A pesar de todos estos intentos, no logramos encontrar en ninguna de las dos situaciones un mutante de la proteína completa que no interactuara con Cdt2 (**Figura 21 y 22**).

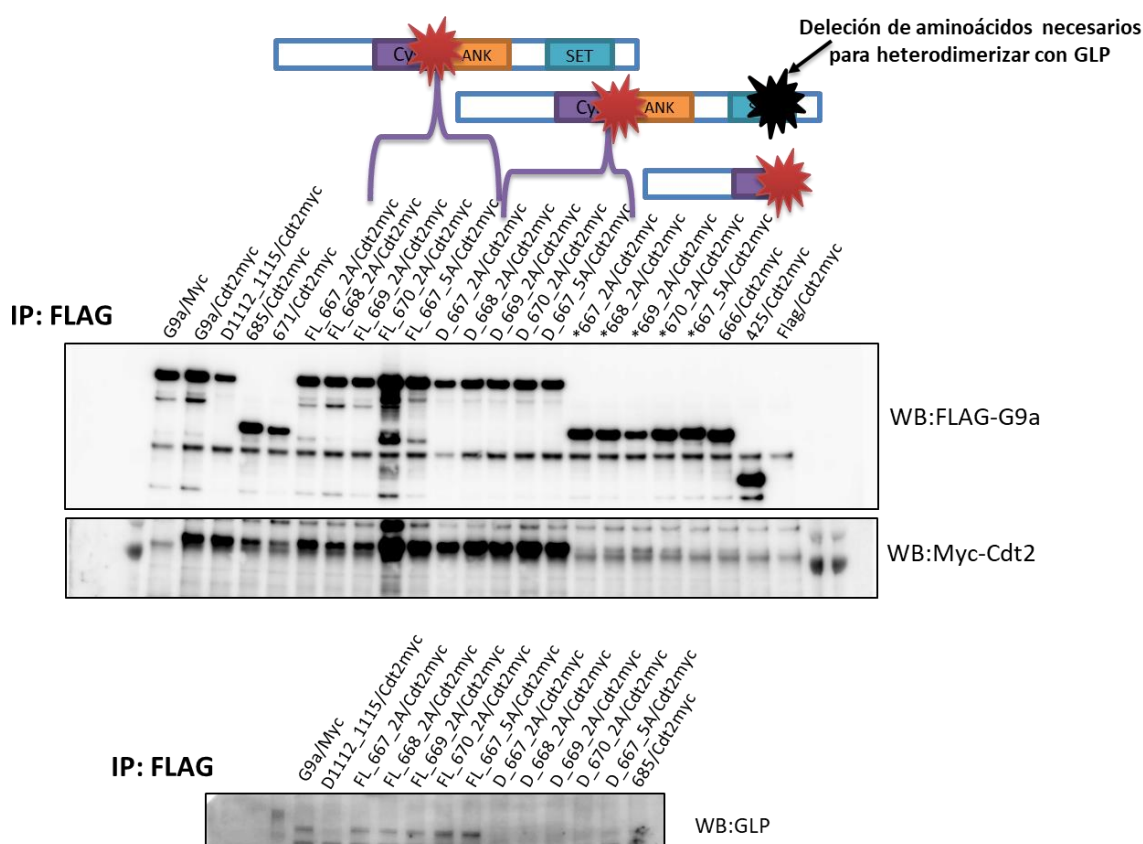


Figura 21. Identificación de la región de interacción de G9a con Cdt2 utilizando mutantes con sustituciones de alaninas II. Las células Hek293T fueron transfectadas con: una construcción que expresa G9a y un vector vacío

(sigue pie de figura 21) Myc (G9a/Myc); o Cdt2myc en combinación con las diferentes construcciones de G9a y sus mutantes de delección y sus mutantes con sustituciones alanina (en el contexto de la proteína completa, del mutante D que no interactúa con GLP y del vector G9a-681); o un vector vacío Flag y Cdt2myc (Flag/Cdt2myc). Se realizó la inmunoprecipitación (IP: FLAG) de G9a y sus mutantes. Los *Western Blot* se revelaron con anticuerpos específicos contra los *tags* FLAG (G9a) y Myc (Cdt2). Se marcan con una representación esquemática los mutantes que tienen alaninas sustituidas en las posibles regiones de interacción en la proteína completa y los que además tienen la delección en el dominio SET que no puede heterodimerizar con GLP. En el último panel se observa la co-inmunoprecipitación de GLP endógeno por los mutantes en el contexto de G9a y del mutante de G9a con la delección.

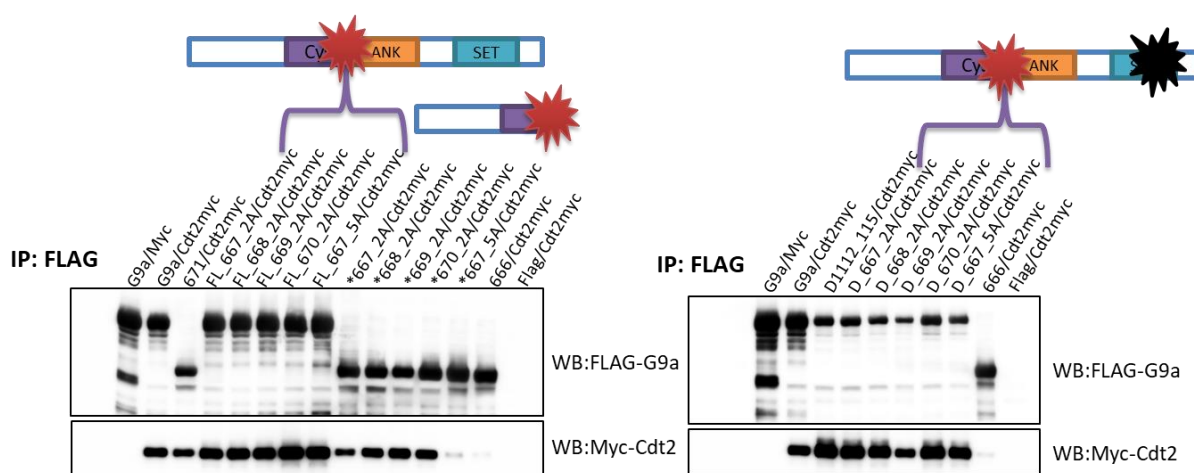


Figura 22. Identificación de la región de interacción de G9a con Cdt2 utilizando la línea celular GLP-KO. Las células que no expresan GLP fueron transfectadas con: una construcción que expresa G9a y un vector vacío Myc (G9a/Myc); o Cdt2myc en combinación con las diferentes construcciones de G9a y sus mutantes de delección y sus mutantes con sustituciones alanina (en el contexto de la proteína completa (FL), del vector G9a-681, y del mutante D que no interactúa con GLP); o un vector vacío Flag y Cdt2myc (Flag/Cdt2myc). Se realizó la inmunoprecipitación (IP: FLAG) de G9a y sus mutantes. Los *Western Blot* se revelaron con anticuerpos específicos contra los *tags* FLAG (G9a) y Myc (Cdt2). Se marcan con una representación esquemática los mutantes que tienen alaninas sustituidas en las posibles regiones de interacción en la proteína completa y los que además tienen la delección en el dominio SET que no puede heterodimerizar con GLP.

Existía la posibilidad de que sólo una de las regiones de G9a fuese suficiente para la interacción con Cdt2, por lo tanto, como última estrategia se realizó el doble mutante. En la construcción de G9a se modificaron por alaninas los residuos entre los aminoácidos 481-489 y 667-671. Como se puede observar en la **Figura 23** este mutante, al igual que las construcciones que contenían cada mutación por separado, fueron capaces de interactuar e inmunoprecipitar Cdt2.

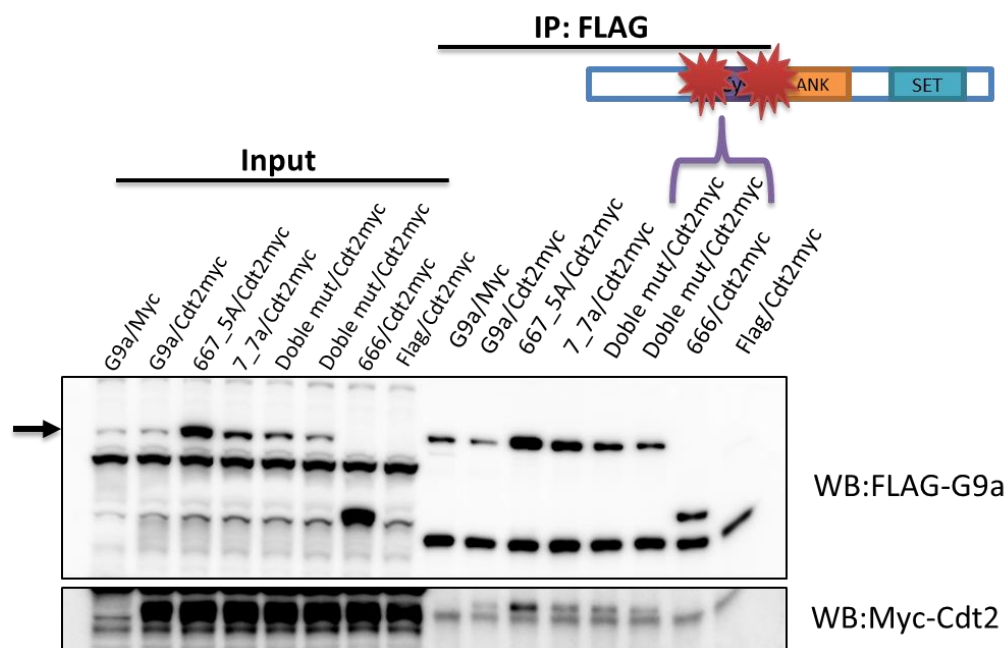


Figura 23. Identificación de la región de interacción de G9a con Cdt2 utilizando el doble mutante. Las células Hek293T fueron transfectadas con: una construcción que expresa G9a y un vector vacío Myc (G9a/Myc); o Cdt2myc en combinación con las diferentes construcciones de G9a y mutantes de delección y sus mutantes con sustituciones alanina en el contexto de la proteína completa, y el mutante que tiene sustituciones por alanina en ambas regiones; o un vector vacío Flag y Cdt2myc (Flag/Cdt2myc). Se realizó la inmunoprecipitación (IP: FLAG) de G9a y sus mutantes. Los Western Blot se revelaron con anticuerpos específicos contra los tags FLAG (G9a) y Myc (Cdt2). Se marcan con una representación esquemática los mutantes que tienen alaninas sustituidas en las dos posibles regiones de interacción en la proteína completa. Se muestra el input de cada muestra.

Considerando todos los resultados hasta ahora descriptos, podemos concluir que las regiones entre los aminoácidos 481-489 y 667-671 no tienen un rol fundamental para la interacción entre G9a y Cdt2. Evidentemente la introducción de mutaciones dentro de la construcción puede causar desarreglos estructurales en la conformación tridimensional de la proteína. Posiblemente por este motivo algunos mutantes de delección pierdan la capacidad de interactuar con la E3 ligasa. Por las dificultades descriptas no pudimos identificar con mayor precisión el *degron* de G9a.

G9a interactúa con los dominios WD40 de Cdt2

Como no fue posible determinar el *degron* de G9a, con el fin de generar un mutante de Cdt2 incapaz de interactuar con la metiltransferasa, se decidió determinar la región de interacción de Cdt2 con G9a. Para determinar con qué región de la E3 ligasa interactuaba G9a se realizó una inmunoprecipitación de construcciones que contenían Cdt2 y dos

mutantes de delección. En la **Figura 24A** puede observarse un esquema de Cdt2 y la posición en la cual se mutaron los residuos para generar los codones de *stop*. Ambos mutantes Cdt2-399 y Cdt2-576, contienen los dominios WD40, y al igual que Cdt2 interactúan con G9a endógeno (**Figura 24B**). Los receptores de sustrato de las E3 ligasas CRLs se caracterizan por contener estos dominios de repetición WD40, y esta estructura es la que funciona como una plataforma para la unión de los sustratos. Debido a que cualquier mutación dentro de ese dominio desensamblaría la estructura proteica, no nos fue posible mapear la región de interacción más allá del aminoácido 399 de Cdt2.

Como control de la especificidad de la co-inmunoprecipitación, se corroboró que el mutante Cdt2-399 no interactúa con DDB1 (**Figura 24B**, último panel), esta proteína que forma parte del complejo CRL, actúa como puente y une al receptor de sustrato con la Cullina4.

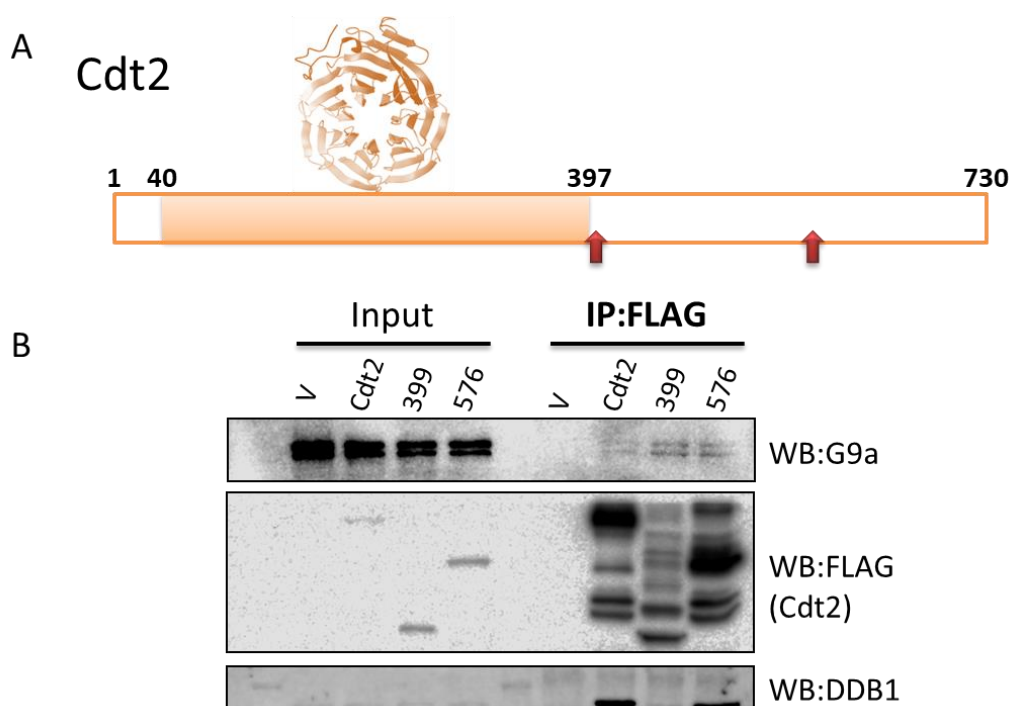


Figura 24. Identificación de la región de Cdt2 que interactúa con G9a. (A) Representación esquemática de Cdt2, se marca la región que forma la estructura de los dominios WD40. (B) Las células Hek293T fueron transfectadas con una construcción que expresa un vector vacío (Vector), Cdt2-FLAG-HA (Cdt2) o sus mutantes de delección (399 y 576). Se realizó la inmunoprecipitación (IP: FLAG) de Cdt2 y sus mutantes. Los *Western Blot* se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas detalladas en la imagen o el tag FLAG (Cdt2).

Caracterización molecular de la interacción

Cdt2 también interactúa con ZNF644 y WIZ

Durante el desarrollo de esta tesis dos grupos de investigación aportaron nuevos datos muy interesantes en relación con el funcionamiento del complejo enzimático G9a/GLP. Por un lado, en 2015, el grupo del Dr. Xiaochun Yu (*Division of Molecular Medicine and Genetics, University of Michigan Medical School, United States*) encontró que G9a y GLP interactuaban con dos proteínas, ZNF644 y WIZ. Estas dos proteínas reconocen secuencias nucleotídicas consenso y median la interacción del complejo con el ADN (106). A partir de esta información, revisamos los datos obtenidos de nuestras purificaciones e identificamos que ambas proteínas se encontraban, al igual que G9a y GLP, dentro de los primeros 12 posibles interactores de Cdt2 en el orden de mérito antes mencionado (**Tabla 3, Figura 25A**).

Asimismo, el grupo del Dr. David Cortez (*Department of Biochemistry, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville*) en un trabajo publicado unos meses después demostró que el complejo multiproteico formado por G9a/GLP/ZNF644 y WIZ formaba parte del replisoma. El replisoma es una gran maquinaria proteica compuesta por polimerasas, helicasas, nucleasas y E3 ligasas necesarias para la síntesis del ADN, y recientemente se comprobó la existencia de factores que regulan la modificación post-traducciona de las histonas, como G9a y GLP. Los datos publicados muestran que la proteína ZNF644 está altamente enriquecida en las horquillas de replicación, que co-localiza con PCNA en estos sitios, y además que los niveles de G9a y GLP se correlaciona con la abundancia de ZNF644 en el ADN naciente (107). Además, a partir del análisis detallado de los datos crudos del trabajo antes citado, se confirmó que Cdt2 estaba presente también en los replisomas y que los niveles de Cdt2 también se correlacionan con los de todo el complejo antes mencionado.

Teniendo en cuenta estos datos se decidió estudiar si en nuestras condiciones experimentales CRL4^{Cdt2} se encontraba asociado también con ZNF644 y WIZ. Como se observa en la **Figura 25B** Cdt2 sobre-expresado interactúa con ZNF644 y WIZ endógenos en la fracción cromatínica. Las purificaciones antes mencionadas se llevaron a cabo también en

presencia de inhibidor de proteosoma (MG132) y de E3 ligasas CRLs (MLN4924). En dicho experimento también fuimos capaces de verificar la interacción de Cdt2 con las proteínas que forman parte del complejo CRL4^{Cdt2}.

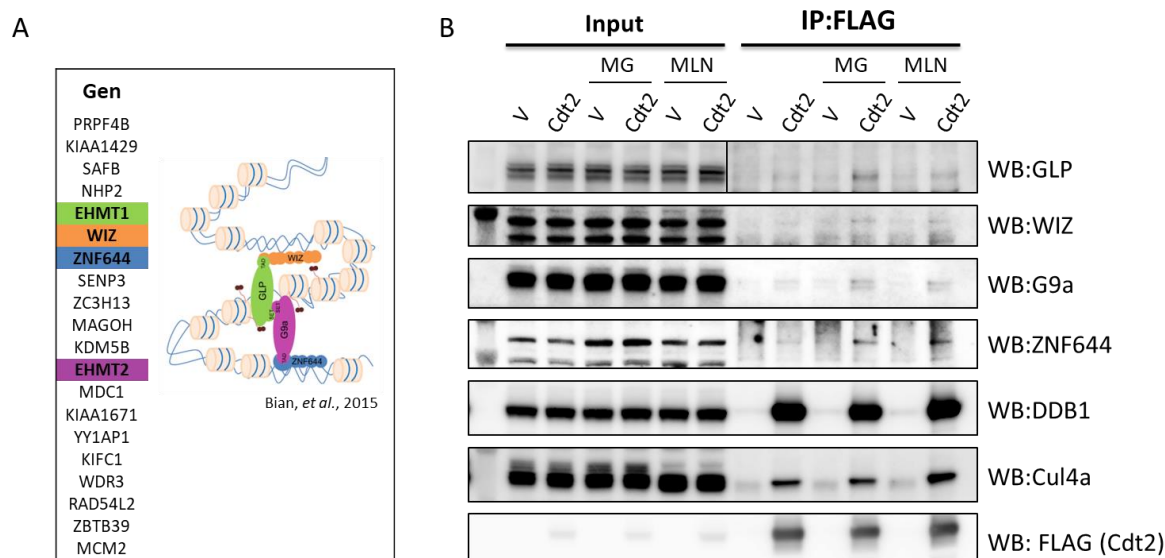


Figura 25. Cdt2 interactúa con todos los miembros del complejo G9a/GLP/ZNF644 y WIZ. (A) Lista de interactores de Cdt2 en la fracción cromatínica, se encuentran señalados los miembros del complejo G9a/GLP/ZNF644 y WIZ. (B) Las células Hek293T fueron transfectadas con una construcción que expresa Cdt2-FLAG-HA (Cdt2) o un vector vacío (V). Las muestras fueron tratadas con inhibidor de proteosoma (MG132) e inhibidor indirecto de cullinas (MLN4924). Se realizó la inmunoprecipitación (IP: FLAG) de Cdt2. Los Western Blot se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas detalladas en la imagen o el tag FLAG (Cdt2). Se observan los input de cada muestra.

Nuestros resultados demuestran que CRL4^{Cdt2} se asocia al complejo formado por G9a/GLP/ZNF644 y WIZ y es de esperar que esta interacción tenga un rol activo en procesos relacionados con la replicación y la reparación del ADN.

Estudio de los efectos de CRL4^{Cdt2} en la vida media de los distintos componentes del complejo G9a/GLP/ZNF644 y WIZ

La ubiquitinación de proteínas es una modificación postraducciona que consiste en la unión de moléculas de ubiquitina a sustrato. Una de las funciones mejor caracterizada de esta modificación es la señalización para la degradación proteosomal del sustrato ubiquitinado. No obstante, se ha demostrado que la ubiquitinación puede participar en distintas señalizaciones dentro de las células dependiendo de la lisina involucrada en la unión. Además, sobre un sustrato puede unirse una única molécula en un solo sitio, o en

varios a lo largo de la proteína, lo que hace aún más intrincado el estudio de este tipo de modificaciones post-traduccionales.

Para verificar si una E3 ligasa específica contribuye al control de la degradación de la proteína de interés, se procede a depletar la E3 ligasa de las células y observar si hay cambios en la tasa de degradación del sustrato en estudio. A este fin se utiliza el compuesto cicloheximida, que inhibe la síntesis proteica y se utiliza en el estudio de la vida media de las proteínas (**Figura 26A**).

Utilizando ARN de interferencia contra Cdt2, evaluamos la vida media de G9a, GLP, ZNF644 y WIZ con el fin de determinar si se encontraban afectadas por la actividad de la E3 ligasa. Como puede observarse en la **Figura 26B**, los niveles proteicos de G9a, GLP, ZNF644 y WIZ son muy estables hasta después de 5 horas, demostrando que el silenciamiento de Cdt2 no afecta la vida media de las metiltransferasas.

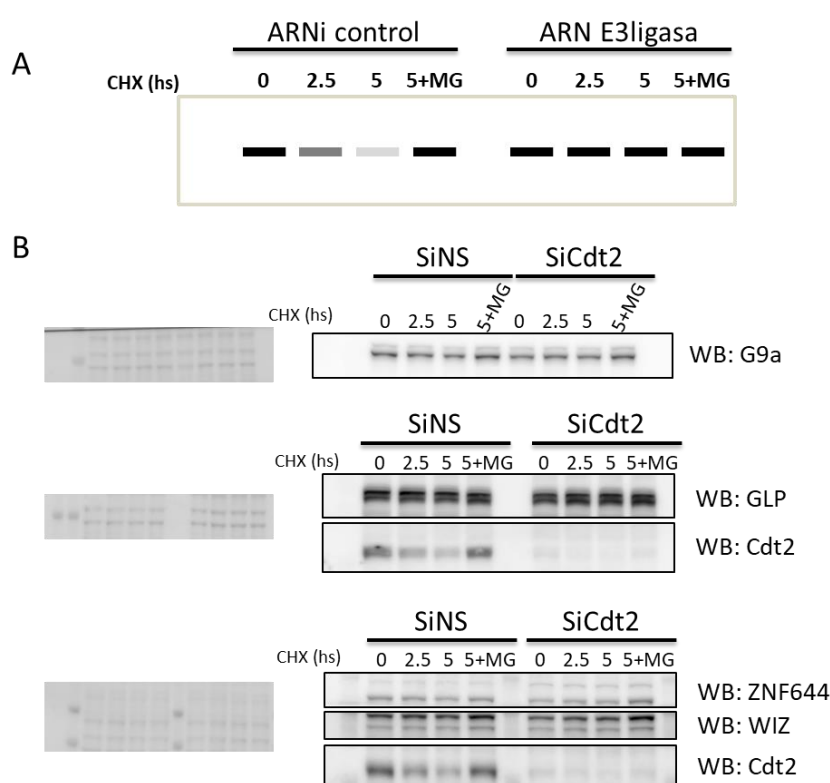


Figura 26. Efecto del silenciamiento de Cdt2 en la vida media de los distintos componentes del complejo G9a/GLP/ZNF644 y WIZ. (A) La cicloheximida inhibe la síntesis proteica y se utiliza en el estudio de la vida media de las proteínas. (B) En los paneles de la derecha se observa la vida media de las proteínas del complejo estudiado en la condición control y en ausencia de la E3 ligasa. A la izquierda se observa la tinción con Ponceau de cada membrana, que se utilizó como control de carga. Los tiempos de tratamiento se detallan en la imagen. Los Western Blot se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas detalladas en la imagen.

Si bien pudimos demostrar la interacción entre CRL4^{Cdt2} y el complejo G9a/GLP/ZNF644 y WIZ nuestros resultados indican que esta E3 ligasa no regula los niveles proteicos totales de los miembros de este complejo en la fracción cromatínica. Sin embargo, estos resultados no nos permiten descartar que sólo una pequeña fracción de estas metiltransferasas, o de los factores que median su unión con el ADN, se encuentren regulados por la E3 ligasa bajo alguna condición determinada.

Generación de líneas celulares que expresan Cdt2 de manera inducible

Como se mencionó anteriormente, CRL4^{Cdt2} es un factor esencial para la normal progresión ciclo celular y está ampliamente demostrado que el silenciamiento de Cdt2 por tiempos prolongados generan re-replicación e inestabilidad genómica (137). Como se observa en la **Figura 27A y B**, cuando los niveles de Cdt2 disminuyen por más de 24 hs, se producen sucesivas rondas de replicación del ADN sin división celular que producen un aumento en el tamaño nuclear. Asimismo, mientras que en las células transfectadas con ARN de interferencia control pueden observarse células dividiéndose activamente, esto no se observa cuando Cdt2 se encuentra silenciado.

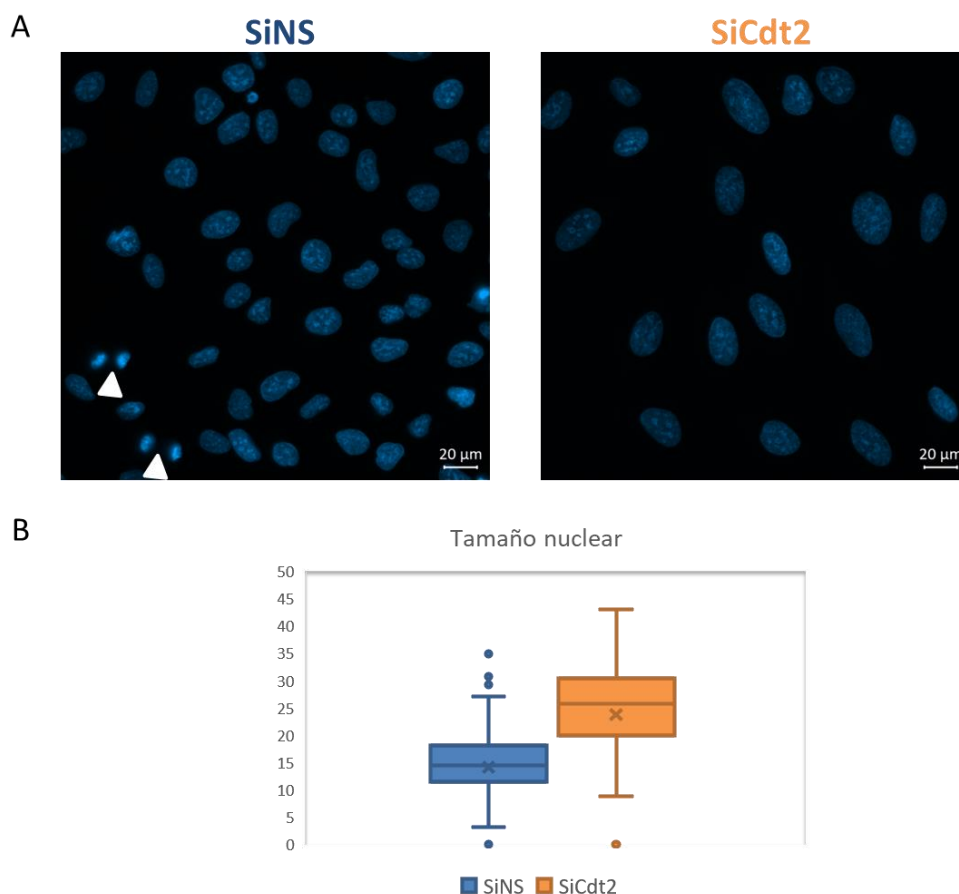


Figura 27. El silenciamiento de Cdt2 produce un aumento en el tamaño nuclear. (A) Tinción con DAPI de los núcleos en la condición control (SiNS) y Cdt2 silenciado (SiCdt2) por 48 hs. (B) Cuantificación del tamaño de los núcleos en ambas condiciones.

Con el objeto de estudiar el efecto de la depleción de Cdt2 a tiempos cortos y evitar las consecuencias que se presentan al utilizar ARN de interferencia, se decidió generar una línea celular estable que permite regular la expresión de Cdt2 en modo inducible. Asimismo, esta línea celular fue transducida con un shARN dirigido contra el 3' UTR de Cdt2. De este modo en presencia del inductor (Doxiciclina) se puede lograr una expresión regulable de Cdt2 en las células. Al remover el inductor del medio, la expresión de Cdt2 se reduce casi de manera completa en una ventana temporal de 14 o 16 horas. (**Figura 28A y B**).

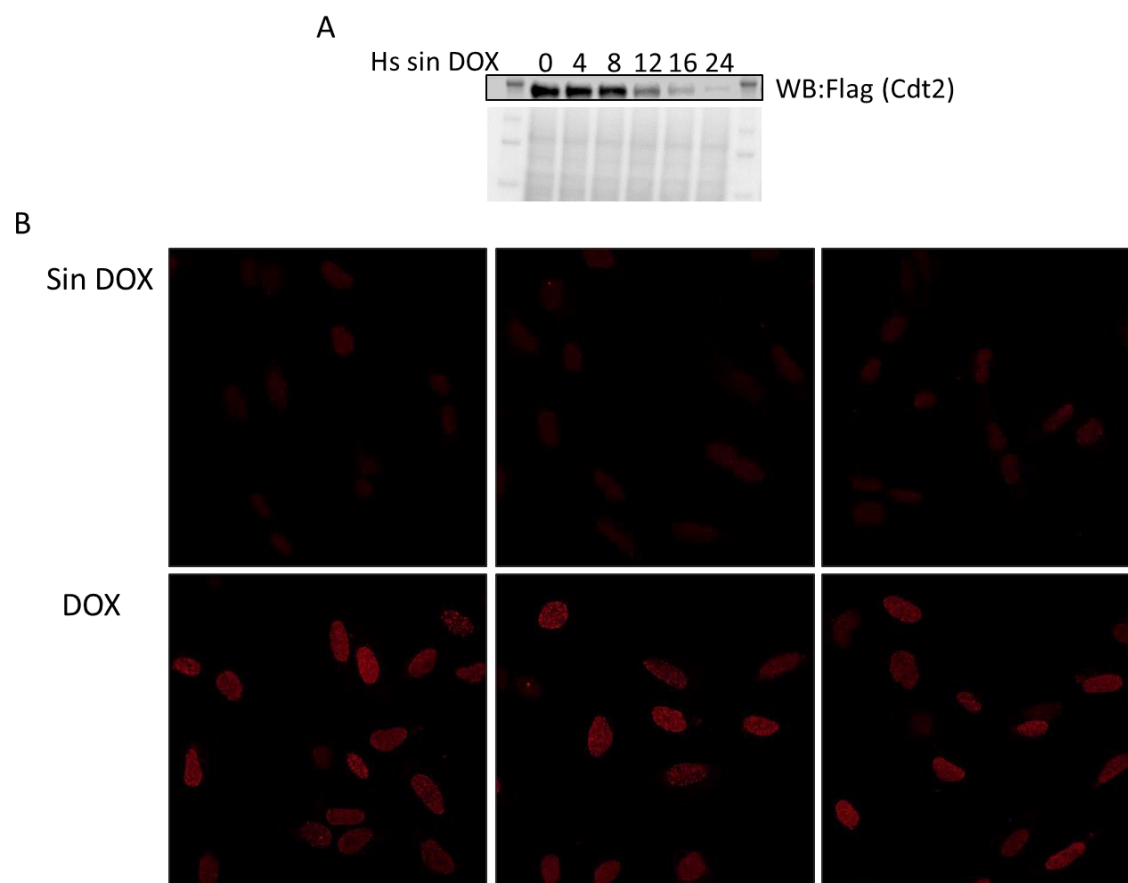


Figura 28. Caracterización de la línea celular estable que expresa Cdt2 de manera inducible. (A) Cuando se retira el inductor (Doxiciclina) la expresión de Cdt2 en las células se reduce por completo cerca de las 16 hs. (B) La inmunofluorescencia muestra la expresión de Cdt2 sin y con el inductor.

Para descartar que alteraciones por la falta de Cdt2 puedan haber interferido en los estudios antes mencionados, con esta línea celular se realizaron nuevamente los experimentos de cicloheximida para corroborar la estabilidad y la vida media de G9a/GLP/ZNF644 y WIZ sobre la fracción cromatínica.

Los resultados así obtenidos confirman nuestros resultados previos, e indican que CRL4^{Cdt2} no regula la vida media de G9a/GLP/ZNF644 y WIZ (**Figura 29**).

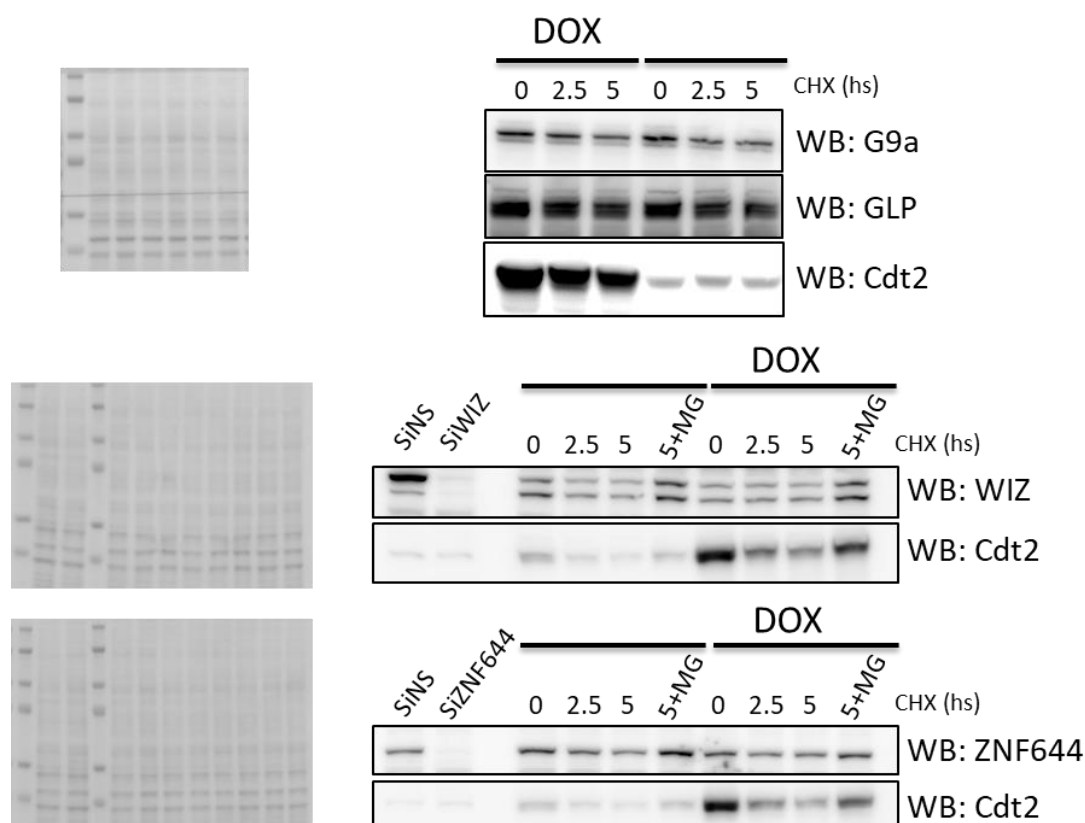


Figura 29. Efecto de la reducción de Cdt2 en la línea celular inducible sobre la vida media de los distintos componentes del complejo G9a/GLP/ZNF644 y WIZ. En los paneles de la derecha se observa la vida media de las proteínas del complejo estudiado en condición sin Cdt2 y en presencia de Cdt2 (DOX). A la izquierda se observa la tinción con *Ponceau* de cada membrana, que se utilizó como control de carga. Los tiempos de tratamiento se detallan en la imagen. Los *Western Blot* se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas detalladas en la imagen. Se utilizó ARN de interferencia control (SiNS), contra WIZ (SiWIZ), contra ZNF644 (SiZNF644) para definir cuál era la banda específica.

Sin embargo, durante la identificación del *degron* de G9a observamos que el mutante que no contaba con el dominio SET terminal, G9a-922, co-inmunoprecipitaba más Cdt2 (**Figura 17B y C**). La región de interacción entre G9a/GLP en el dominio SET se encuentra delimitada y se conocen cuáles son los aminoácidos necesarios para la formación del complejo. A partir de esta información, generamos construcciones que expresan las versiones mutantes de estas proteínas en esta región. Los mutantes así generados no poseen actividad catalítica y difieren en la capacidad de interacción a través de sus dominios SET. Utilizando estos mutantes de G9a y GLP se decidió evaluar si estas características influenciaban su interacción con Cdt2. Por un lado, los diferentes mutantes de G9a lograron co-inmunoprecipitar Cdt2 de forma similar en la fracción cromatínica (**Figura 30A**, también puede observarse la capacidad de interacción de cada mutante funcional de G9a con GLP

endógeno). En cambio, como se puede observar en la **Figura 30B** los mutantes de GLP difieren en la capacidad de co-inmunoprecipitar con Cdt2. Específicamente, el mutante de GLP-NHLE co-inmunoprecipita más Cdt2 que el control y en concordancia con los datos publicados interactúa menos con G9a. En línea con lo anterior, el mutante de GLP-Del1198-1201, que no puede interactuar con G9a, co-inmunoprecipita más Cdt2 que el control y que el mutante GLP-NHLE. Asimismo, utilizamos otro mutante, GLP-C1201A que no tiene actividad catalítica pero que puede interactuar con G9a, y observamos que, a diferencia de los otros mutantes, GLP-C1201A y GLP normal co-inmunoprecipitan Cdt2 a niveles muy similares.

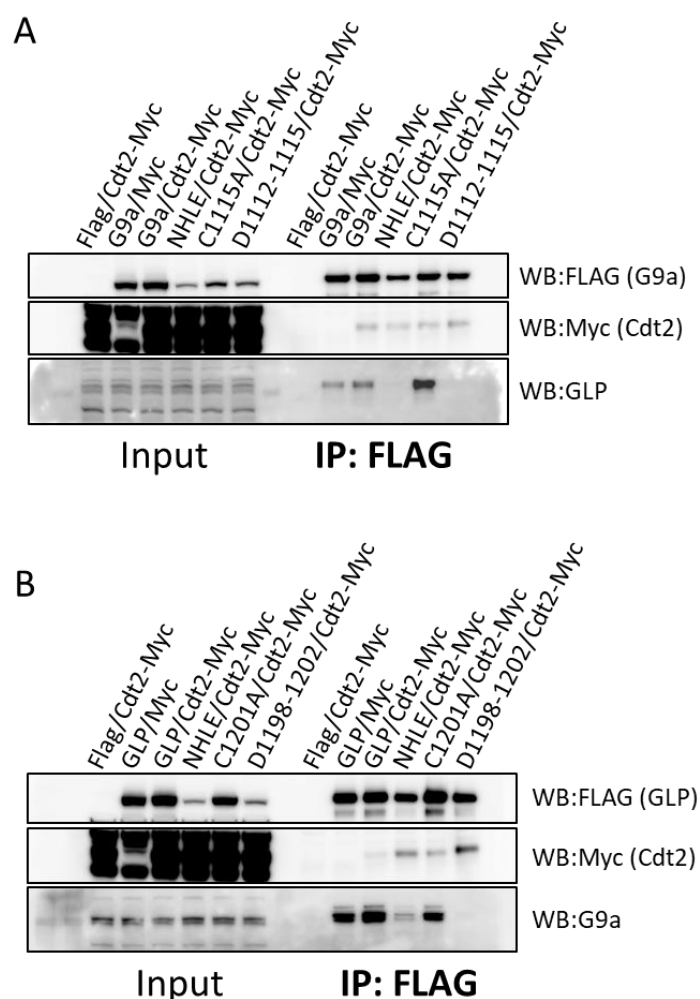


Figura 30. Interacción de los mutantes catalíticos de G9a y GLP con Cdt2. Las células Hek293T fueron transfectadas con: un vector Flag y Cdt2-Myc (Flag/Cdt2-Myc); o con G9a y un vector Myc (G9a/Myc); o con construcciones normales y mutantes catalíticas de G9a (A) y GLP(B). Se observa los lisados celulares totales a la izquierda y la IP:FLAG a la derecha. Se observa la capacidad de cada mutante de G9a y GLP de co-inmunoprecipitar con Cdt2-Myc. Los Western Blot se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas detalladas en la imagen y los tag FLAG (G9a) y Myc (Cdt2).

Estos resultados indicaban que la interacción entre GLP y Cdt2 parecía estar afectada por su capacidad de interacción con G9a, pero no por su actividad catalítica. Por este motivo, nos preguntamos si CRL4^{Cdt2} regulaba específicamente un subconjunto de GLP que no interactuaba con G9a. Para determinar si la capacidad de interacción de GLP y G9a influenciaba la vida media de GLP se realizaron ensayos de cicloheximida en la línea celular que expresa Cdt2 de manera inducible. Como puede observarse en la **Figura 31**, los niveles basales y la vida media de GLP-Del1198-1201 y GLP-NHLE son menores que los del control, tanto en la fracción soluble como en la fracción cromatínica. Sin embargo, cuando disminuyen los niveles proteicos de Cdt2 estos mutantes no aumentan su estabilidad. Nuevamente, el mutante GLP-C1201A que es capaz de dimerizar con G9a y puede formar un complejo con capacidad catalítica se expresa de forma similar al control, y aunque tiene una estabilidad ligeramente menor que la de la proteína normal, la vida media tampoco está afectada por los niveles proteicos de Cdt2 en las células estudiadas.

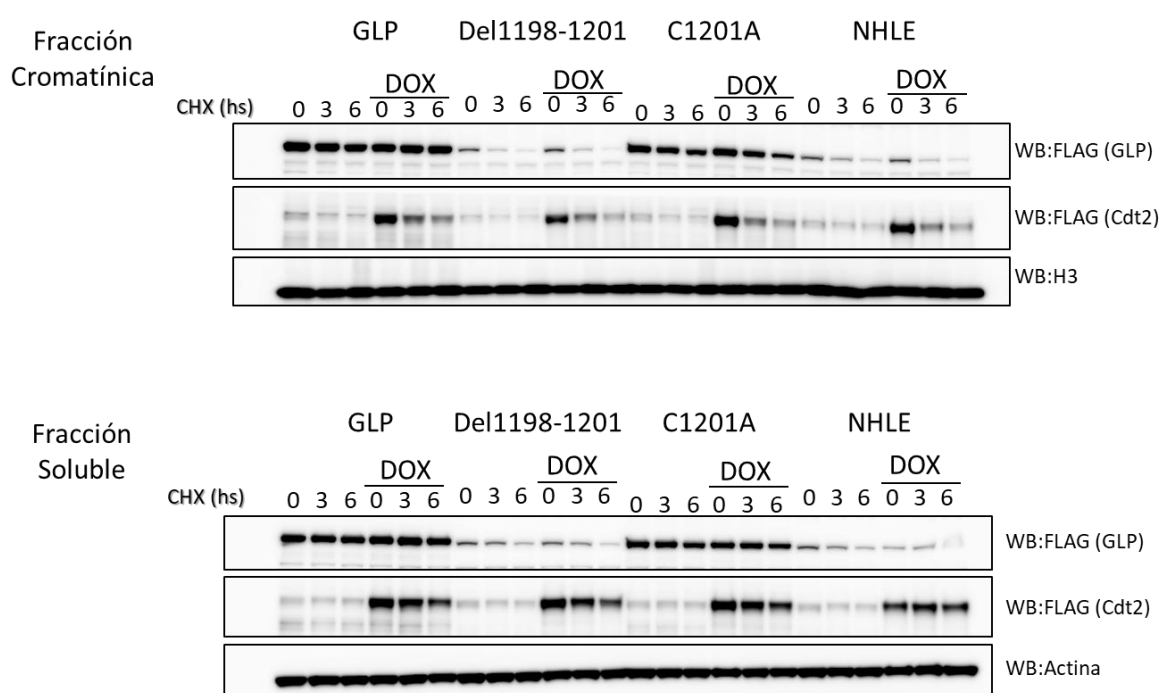


Figura 31. Efecto de la reducción de Cdt2 en la vida media de los mutantes catalíticos de GLP. La línea celular que expresa Cdt2 de manera inducible fue transfectada con los diferentes mutantes catalíticos de GLP. Las muestras fueron separadas en dos fracciones (Fracción Soluble y Fracción Cromatínica). La condición en presencia de Cdt2 está marcada como DOX. Los tiempos de tratamiento se detallan en la imagen. Los Western Blot se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas detalladas en la imagen y el tag Flag que reconoce la construcción de GLP sobre-expresada y Cdt2 inducible.

Por lo tanto, si bien la interacción entre GLP y Cdt2 parecería estar influenciada por su capacidad de formar un complejo estable con G9a, y en cambio, no por su actividad catalítica, confirmamos que la E3 ligasa CRL4^{Cdt2} no regula los niveles proteicos de GLP.

Análisis de los niveles proteicos de G9a y GLP a través del ciclo celular

La mayoría de los sustratos descritos de CRL4^{Cdt2} oscilan durante el ciclo celular, con niveles máximos en la fase G1 del ciclo celular y mínimos durante la fase S, en coincidencia con el inicio de la replicación (138). Con el fin de evaluar posibles variaciones en los niveles proteicos de G9a y GLP durante el ciclo celular, tanto en la fracción soluble como en la cromatínica, se utilizaron dos métodos de sincronización diferentes. Por un lado, las células se sincronizaron en G1/S con un doble bloqueo con Timidina, que permite estudiar con detalle la evolución desde la fase S hacia la fase G2. Como se observa en la **Figura 32** en los paneles de la izquierda los niveles proteicos de G9a y GLP se mantienen estables en la fracción cromatínica durante la progresión de la fase S.

Por otro lado, se sincronizaron las células con *Nocodazole*, que imposibilita la formación del huso acromático y arresta las células en mitosis, permitiendo estudiar la transición de la fase G1 a la fase S. Como se observa en los paneles de la derecha de la **Figura 32** los niveles proteicos de G9a y GLP aumentan gradualmente en la fracción cromatínica una vez que las células salen de mitosis y entran nuevamente en G1. Si bien se observa que los niveles proteicos de G9a y GLP aumentan durante la fase G1 del ciclo celular sobre la cromatina, estos se mantienen estables durante la progresión hacia la fase S del ciclo celular.

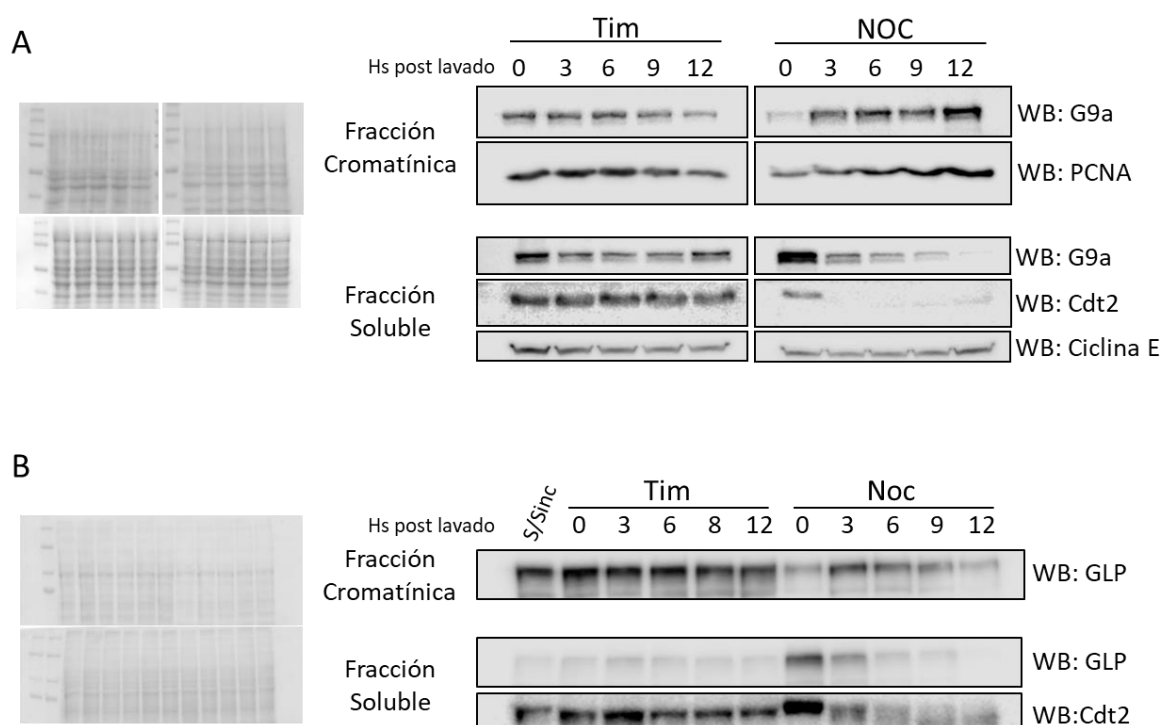
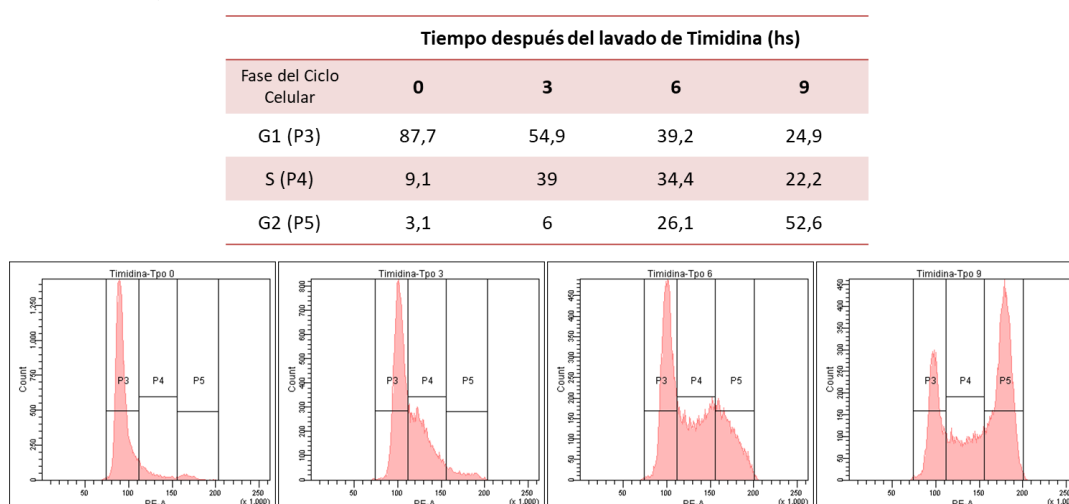


Figura 32. Análisis de los niveles proteicos de G9a y GLP a través del ciclo celular. (A) Los niveles de G9a en ambas fracciones a distintos tiempos de la sincronización con Timidina y Nocodazole. (B) Los niveles de GLP en ambas fracciones a distintos tiempos de la sincronización con Timidina y Nocodazole. A la izquierda se observan las tinciones con *Ponceau* utilizadas como control de carga. Los tiempos de cada punto de la sincronización se detallan en la imagen. Los *Western Blot* se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas detalladas en la imagen.

En la **Figura 33** se pueden observar los perfiles del ciclo celular de las muestras recolectadas a partir del momento inicial de la sincronización y en cada tiempo indicado. También se encuentra detallado en una tabla el porcentaje de células en cada fase del ciclo en cada uno de los puntos en los cuales se tomó una muestra. Estos datos se tuvieron en cuenta para corroborar la sincronización. En concordancia con esto, como control de la sincronización se observaron los niveles de PCNA y la Ciclina E, que poseen sus picos máximos durante la fase S del ciclo celular.

Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular durante la sincronización con Timidina



Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular durante la sincronización con Nocodazole

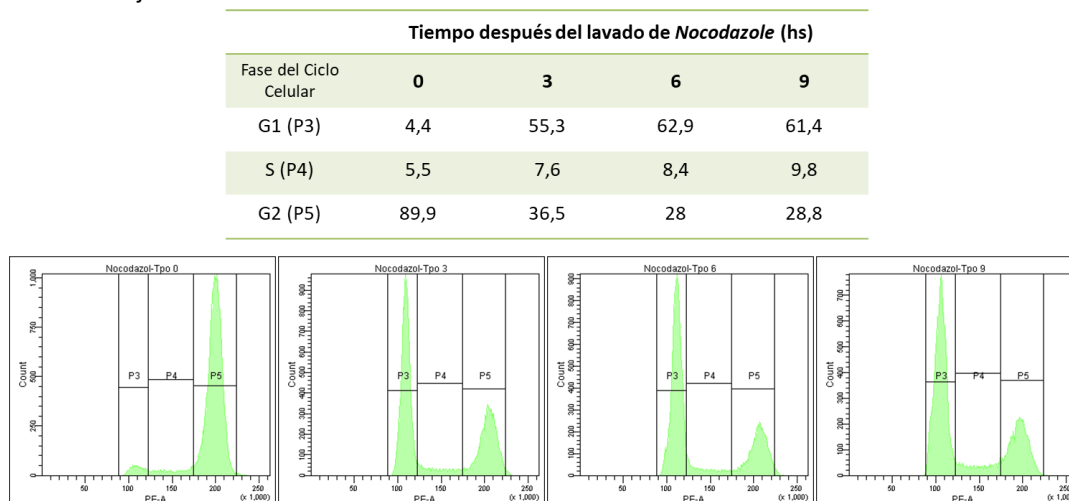


Figura 33. Perfiles del ciclo celular de las muestras sincronizadas con Timidina y Nocodazole. Los perfiles de ciclo celular y la tabla en color rosa se corresponden a la sincronización con Timidina, en color verde se corresponden con la sincronización con Nocodazole. Las muestras fueron recolectadas a partir del momento inicial de la sincronización y en cada tiempo indicado. También se encuentra detallado en una tabla el porcentaje de células en cada fase del ciclo en cada uno de los tiempos en los cuales se tomó una muestra de sincronización.

Nuestros resultados muestran que los niveles proteicos de G9a y GLP no varían durante la progresión del ciclo celular en concordancia con el hecho de que CRL4^{Cdt2} no promueve su degradación proteosomal.

Estudio del efecto de CRL4^{Cdt2} en la poliubiquitinación de G9a, GLP, ZNF644 y WIZ

Para evaluar la ubiquitinación de G9a/GLP/ZNF644 y WIZ se utilizó una técnica muy robusta que permite la purificación de proteínas poliubiquitinadas. La misma se basa en la

utilización de dominios en tándem de unión a ubiquitinas resistentes a tripsina (*trypsin-resistant tandem ubiquitin-binding entity(ies)* (TR-TUBE)). TR-TUBE protege las proteínas conjugadas con poliubiquitina tanto de la degradación proteosomal como de las enzimas deubiquitinasas (DUB) en los lisados celulares, tan eficientemente como los inhibidores específicos de estas enzimas. Además, estos dominios de unión a ubiquitina están etiquetados con FLAG que permite una eficiente purificación (**Figura 34A**).

Para la puesta a punto de esta técnica se utilizó una construcción que expresa TR-TUBE, así como una versión mutante deficiente en la interacción con las cadenas de poliubiquitina, TR-TUBE-Mut. Este última, posee en su secuencia aminoacídica alaninas que sustituyen dos leucinas en los dominios de unión a ubiquitina, y dicha sustitución se repite en cada una de las cuatro copias en tándem de los dominios que la construcción posee (139, 140). Como control positivo del experimento fuimos a analizar el nivel de ubiquitinación de la proteína p21 que se conoce posee una vida media muy corta debido a su degradación proteosomal constitutiva. Como puede observarse en la **Figura 34B** sólo la construcción TR-TUBE es capaz de inmunoprecipitar de modo eficiente versiones poliubiquitinadas de p21. En las mismas condiciones experimentales fuimos capaces de purificar G9a poliubiquitinado.

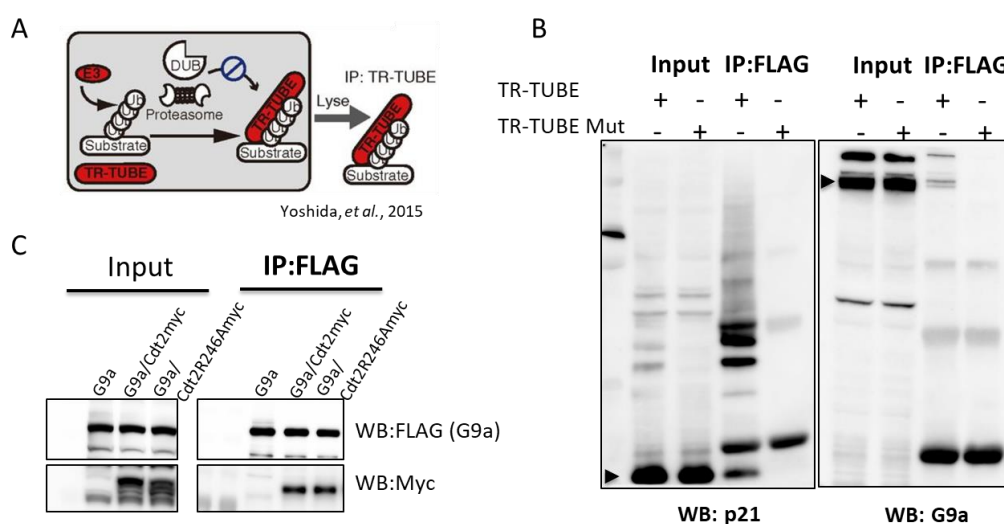


Figura 34. Puesta a punto de la técnica para la inmunoprecipitación de sustratos poliubiquitinados TR-TUBE. (A) Representación esquemática del funcionamiento de la técnica TR-TUBE (Yoshida, et al., 2015). (B) Las células Hek293T fueron transfectadas con una construcción que expresa TR-TUBE o su versión mutante. Se realizó una inmunoprecipitación de FLAG, y se corroboró la inmunoprecipitación de p21 y de G9a poliubiquitinado. Lisados celulares totales en la izquierda e IP:FLAG (TR-TUBE) en la derecha. (C) Las células Hek293T fueron transfectadas con una construcción G9a en combinación con un vector Myc vacío, Cdt2myc o el mutante Cdt2R246Amyc. Input en la izquierda e IP:FLAG (G9a) en la derecha. Los Western Blot se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas detalladas en la imagen y los tag FLAG (G9a) y Myc (Cdt2).

Una vez puesta a punto la técnica, se decidió evaluar si la sobre-expresión de Cdt2 aumentaba los niveles de poliubiquitinación de G9a y GLP. La estrategia consistió en sobre-expresar Cdt2, así como también una construcción que expresa una versión mutante de Cdt2 que se generó por mutagénesis (Cdt2R246A)(58, 77). Este mutante de Cdt2 tiene la capacidad de interactuar con G9a (**Figura 34C**), pero es incapaz de ligar ubiquitina a sus interactores, debido a que no se asocia al complejo CRL4 porque no se puede unir a DDB1. Al sobre-expresar el receptor de sustrato de la E3 ligasa CRL4^{Cdt2}, esperábamos observar un aumento en los niveles de poliubiquitinación de G9a, que se revertiría cuando se sobre-expresara el mutante Cdt2R246A.

En la **Figura 35**, a la izquierda se muestran los lisados totales de cada muestra, y a la derecha la inmunoprecipitación de TR-TUBE. Como puede observarse la sobre-expresión de Cdt2 no produce un aumento en los niveles de las formas poliubiquitinadas de G9a y GLP. Como es de esperar, en las calles control sin transfectar, TR-TUBE mutante y TR-TUBE mutante más Cdt2 (7, 8 y 10) no se observa la presencia de formas poliubiquitinadas de estas proteínas.

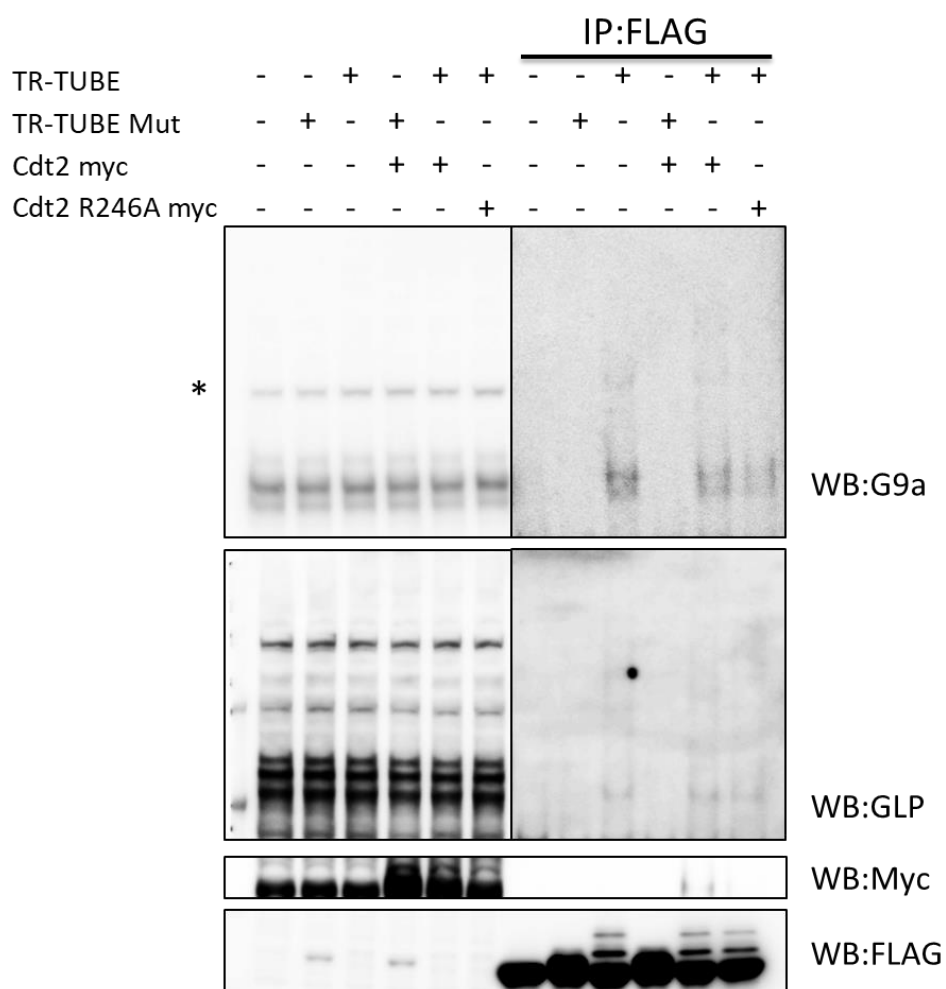


Figura 35. Estudio del efecto de $CRL4^{Cdt2}$ en la poliubiquitinación de G9a (primer panel) y GLP (segundo panel). Las células fueron transfectadas con TR-TUBE o su versión mutante en combinación con la construcción que expresa Cdt2Myc y Cdt2R246A. Input en la izquierda e IP:FLAG (TR-TUBE) en la derecha. Los *Western Blot* se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas detalladas en la imagen y los *tag* FLAG (TR-TUBE) y Myc (Cdt2). En el panel anti-Myc se puede observar en los lisados totales las muestras que sobre-expresan Cdt2 o su versión mutante (calles 4,5 y 6). La versión mutante de TR-TUBE se expresa más en las células que la normal. TR-TUBE mutante puede detectarse en las muestras de los lisados celulares e inmunoprecipita mucho más que TR-TUBE normal (inmediatamente por encima de las inmunoglobulinas que se ven en todas las calles de la inmunoprecipitación puede observarse la diferencia en el nivel de purificación de la versión mutante de TR-TUBE con respecto a la normal, último panel). La flecha marca la banda específica. El asterisco marca una banda inespecífica.

Cuando evaluamos en el mismo experimento ZNF644 y WIZ, se obtuvo el mismo resultado, ambas proteínas inmunoprecipitaron con TR-TUBE, pero la poli-ubiquitinación de estas no se modificó con la sobre-expresión de Cdt2 (**Figura 36**).

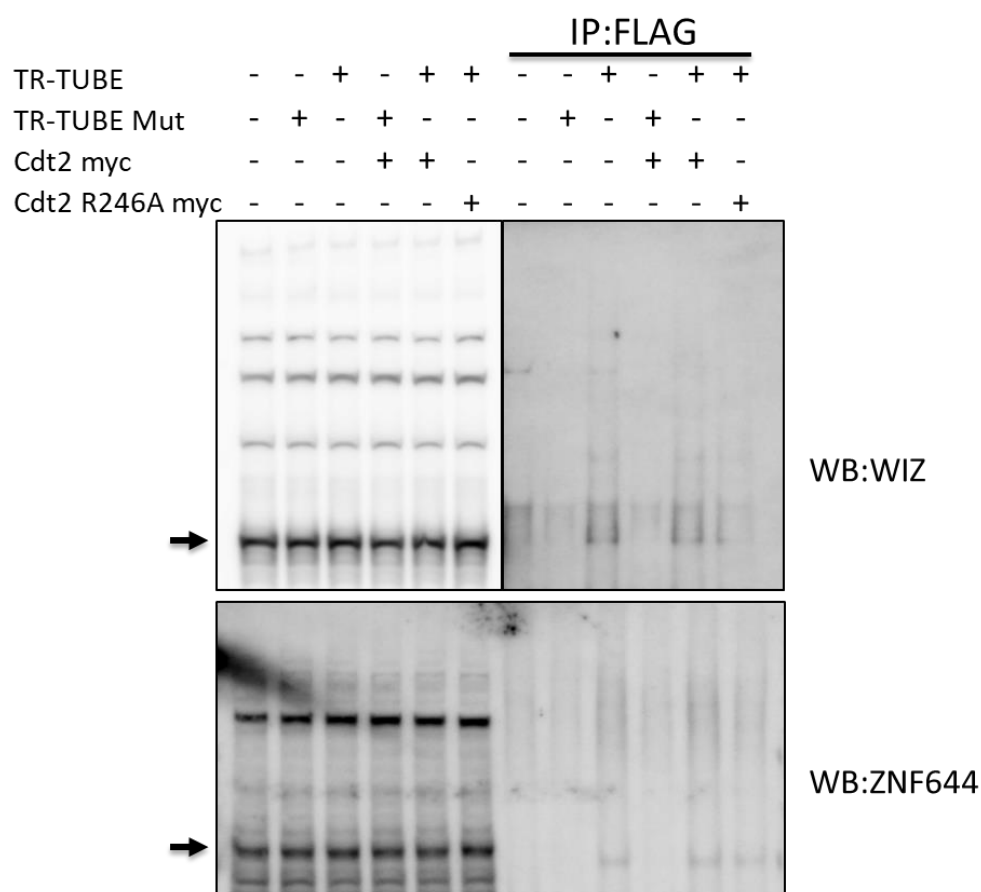


Figura 36. Estudio del efecto de $CRL4^{Cdt2}$ en la poliubiquitinación de WIZ (primer panel) y ZNF644 (segundo panel). Las células fueron transfectadas con TR-TUBE o su versión mutante en combinación con la construcción que expresa Cdt2Myc y Cdt2R246A. Lisados celulares totales en la izquierda e IP:FLAG (TR-TUBE) en la derecha. Los Western Blot se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas detalladas en la imagen. La flecha marca la banda específica.

En base a los resultados antes mencionados podemos concluir que $CRL4^{Cdt2}$ no afecta la poliubiquitinación de G9a/GLP/ZNF644 y WIZ. Sin embargo, a pesar de estos resultados, no podemos descartar que Cdt2 medie la monoubiquitinación de alguna de estas proteínas, así como tampoco se puede descartar que la poliubiquitinación suceda como respuesta a un estímulo determinado.

Generación de líneas celulares mediante la técnica de CRISPR/Cas9

Una vez validada la interacción entre la E3 ligasa $CRL4^{Cdt2}$ y G9a y GLP se generaron las herramientas necesarias para el estudio funcional de dicha asociación. Para la evaluación de la implicancia biológica de esta interacción necesitábamos generar líneas celulares deficientes en la expresión de las metiltransferasas de histonas. Para este último objetivo, se generaron líneas celulares *knockout* de G9a y GLP mediante la técnica de CRISPR/Cas9.

Utilizando esta técnica, y luego del chequeo mediante *Western Blot* de aproximadamente 100 clones por cada línea, se lograron obtener líneas estables que no expresan G9a y GLP (**Figura 37**, cada calle se corresponde con un clon individual).

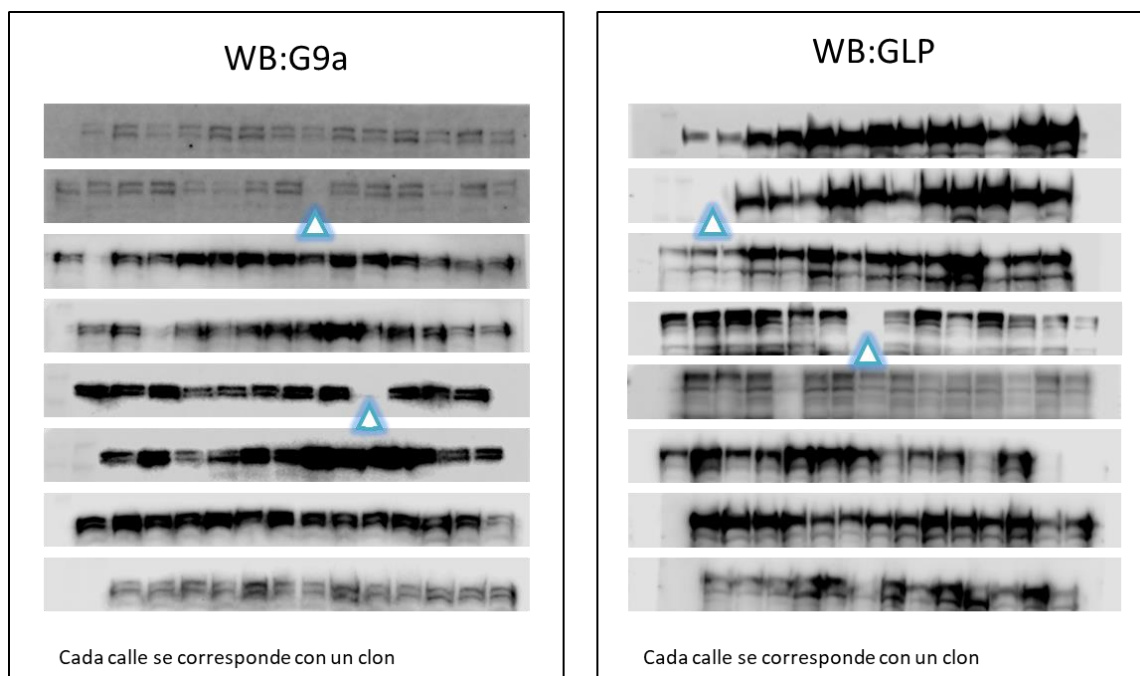
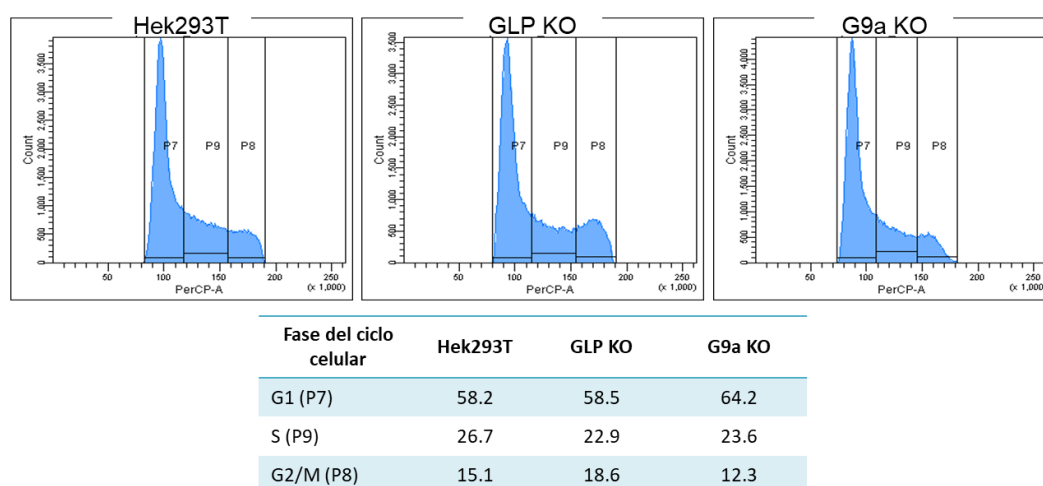


Figura 37. Chequeo de clones G9a-KO y GLP-KO generados por CRISPR/Cas9. Los *Western Blot* se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas detalladas en la imagen. Cada calle se corresponde con un clon. Los clones que no expresan G9a y GLP se encuentran marcados.

Un primer análisis demostró que no existían diferencias importantes en el perfil del ciclo celular de los clones seleccionados con respecto al control (**Figura 38A**). Como se observa en la **Figura 38B**, además se observó que la línea GLP-KO expresa menos G9a consistentemente con lo reportado por otros grupos de investigación (99, 141). Las líneas celulares así generadas fueron utilizadas en el contexto de una colaboración con otro grupo de investigación, y los resultados obtenidos dieron lugar a una publicación de la cual también somos autores (142).

A



B

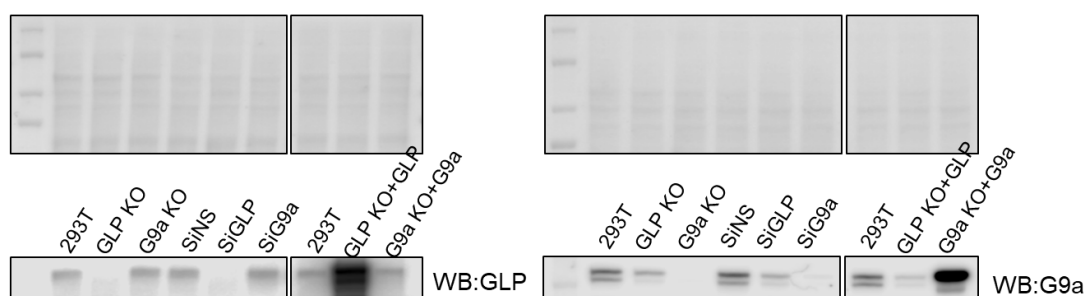


Figura 38. Caracterización de los clones knockout de GLP y G9a. (A) Perfiles de ciclo celular de la línea control y de las líneas GLP-KO y G9a-KO, en la tabla se encuentran detallados los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular en cada línea celular. (B) Caracterización de los niveles de expresión de las líneas generadas. En el panel de arriba se observa la tinción con Ponceau que se utilizó como control de carga. Los Western Blot se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas detalladas en la imagen. Se utilizaron ARNs de interferencia para corroborar la especificidad del knockout.

Seguidamente, decidimos evaluar si la disminución en los niveles de G9a en consecuencia de la disminución de GLP era una consecuencia de la actividad de CRL4^{Cdt2}. Como puede observarse en la **Figura 39** la depleción de Cdt2 en ausencia de GLP no restaura los niveles de G9a, por lo que podemos confirmar que este fenómeno es CRL4^{Cdt2} independiente.

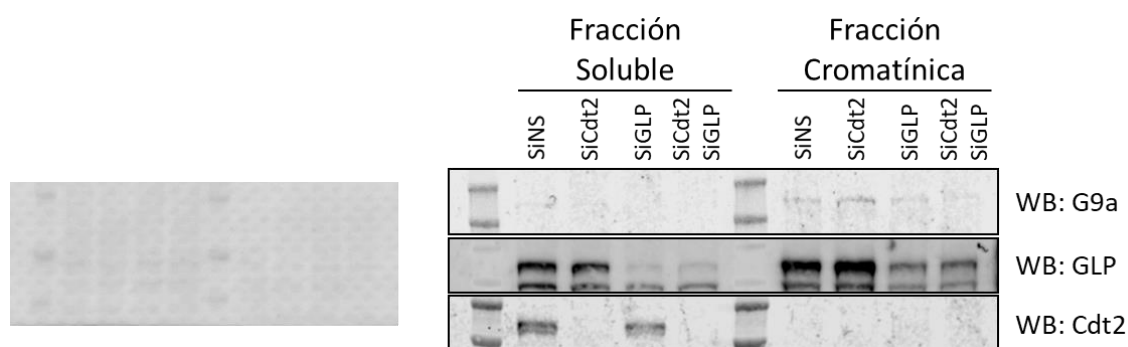


Figura 39. La disminución de G9a luego del silenciamiento de GLP es Cdt2-independiente. Las células HeLa fueron transfectadas con ARN de interferencia (Si-) como se detalla en la Imagen. Las muestras fueron separadas en dos fracciones (Fracción Soluble y Fracción Cromatínica). A la izquierda la tinción con *Ponceau* que se utilizó como control de carga. Los *Western Blot* se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas detalladas en la imagen.

Análisis de modificaciones post-traduccionales de Cdt2

G9a modifica la lisina de la secuencia aminoacídica “TARK” en el N-terminal de la histona 3. En los últimos años se ha reportado que G9a puede además reconocer este motivo en otras proteínas y modificarlo post-traduccionamente (143). Como nuestros resultados indicaban que G9a y GLP no eran sustratos de la E3 ligasa CRL4^{Cdt2}, decidimos evaluar si Cdt2 era un sustrato de la actividad metiltransferasa de G9a. A pesar de que Cdt2 no contiene en su secuencia ningún motivo TARK, si contiene varios dipéptidos “RK” (Arginina-Lisina), que representan la secuencia mínima reconocida por G9a.

En este sentido, con el objeto de verificar si los dipéptidos de Cdt2 eran metilados por G9a y GLP se decidió analizar mediante espectrometría de masa Cdt2 purificado en la línea control, y las líneas *Knockout* de G9a y GLP obtenidas por CRISPR/Cas9 descritas anteriormente. A este fin, las 3 líneas fueron transfectadas transientemente con Cdt2. Las muestras fueron lisadas en un buffer con alta concentración de SDS, sonicadas y posteriormente se diluyó en PBS 1X para realizar la inmunoprecipitación de Cdt2. Para evaluar la eficiencia de la purificación de Cdt2, las muestras eluidas fueron corridas en un gel de acrilamida que se tiñó mediante la tinción de plata (**Figura 40**). Asimismo, debido al rol fundamental que tiene esta E3 ligasa durante la reparación del daño al ADN, se realizaron tratamientos con radiación UV para evaluar si la metilación estaba influenciada por el daño al ADN.

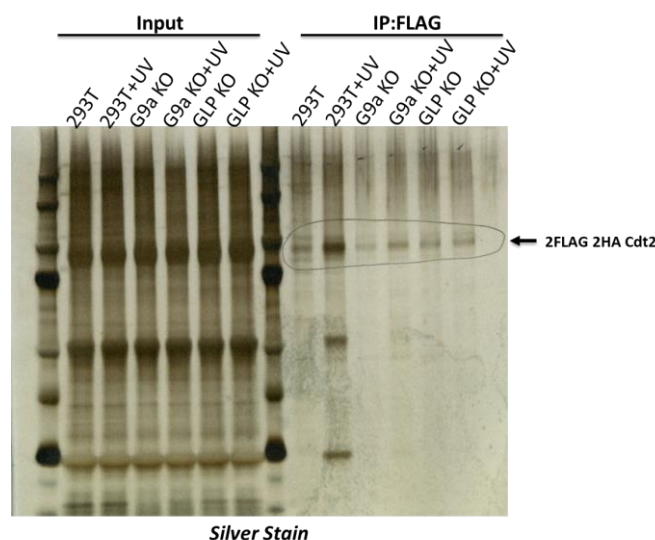


Figura 40. Tinción de plata de la purificación de Cdt2 para el análisis de metilaciones. Las células Hek293T, G9a-KO y GLP-KO fueron transfectadas con Cdt2-FLAG-HA. Se realizó la inmunoprecipitación. Se observan los input y la IP:FLAG.

Tabla 4. Análisis de modificaciones post-traduccionales de Cdt2. En la tabla se detallan los péptidos que se encontraron modificados en cada línea analizada.

Posición inicial	Secuencia	Secuencia Modificada	Porcentaje de metilación					
			293T	293T UV	GLP KO	GLP KO UV	G9a KO	G9a KO UV
78	LYNTESQSFR	LYNTESQSFR(+14.016]	4,0	3,9	4,1	3,1	0,7	3,1
261	SFLYPGSSTR	SFLYPGSSTR(+14.016]	0,1	0,1	0,1	0,1	< 0.1	
393	GLEEKPGGDKLSTVGWASQK	GLEEK(+14.016]PGGDKLSTVGWASQK	5,9	6,4	6,6	5,2	6,5	3,8
436	AKCNPSNSPSSAACAPSCAGDLPLPSNTPTFSIK	AK(+28.031]C(+57.021]NPSNSPSSAAC(+57.021]APSC(+57.021]AGDLPLPSNTPTFSIK (dimethyl)	90,5	91,6	88,3	81,5	75,1	99,2
436	AKCNPSNSPSSAACAPSCAGDLPLPSNTPTFSIK	AK(+42.047]C(+57.021]N(+0.984]PSNSPSSAAC(+57.021]APSC(+57.021]AGDLPLPSNTPTFSIK (trimethyl)	9,9	8,0	11,6	18,5	23,4	0,5
483	RGSVSSVSPKPPSSFK	R.R(+14.016]GSVSSVSPKPPSSFK.M	1,5	0,8				
508	TPSSSPPIPPASETK	TPSSSPPIPPASETK(+14.016]	3,2	3,4	3,6	3,3	3,0	3,3
554	RLDSSCLESVK	RLDSSC(+57.021]LESVK(+14.016]		1,8	1,6	1,7	1,6	1,4
555	LDSSCLESVK	LDSSC(+57.021]LESVK(+14.016]	7,5	5,6	7,6	6,1	8,2	8

El análisis de nuestros resultados muestra que, en líneas generales, no se observaron diferencias significativas en las distintas muestras evaluadas (**Tabla 4**). En particular no se observaron modificaciones post-traduccionales en ninguno de los dipéptidos RK presentes en Cdt2 (**Figura 41, Tabla 5**). Es importante destacar que obtuvimos un 75-80% de cobertura de secuencia de Cdt2.

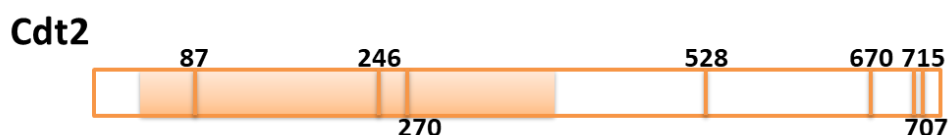


Figura 41. Representación esquemática de la posición de los dipéptidos “RK” de Cdt2.

Tabla 5. Cantidad de péptidos analizados de los dipéptidos “RK” de Cdt2 en cada línea celular.

Posición “RK” en Cdt2	Numero de péptidos analizados					
	293T	293T UV	GLP KO	GLP KO UV	G9a KO	G9a KO UV
87	6	5	5	6	5	6
246	4	2	3	4	2	4
270	4	3	3	3	2	4
528						
670		1				
707	11	12	5	7	2	5
715	11	12	6	8	2	6

En este sentido, aunque en general la cobertura de secuencia de Cdt2 fue bastante alta, algunas de las regiones que contenían dipéptidos “RK” no se encontraban representadas, por lo tanto, no podemos descartar que G9a y GLP puedan modificar a Cdt2 en alguno de estos sitios.

G9a y su rol en la reparación del ADN

G9a cumple varias funciones muy importantes dentro de las células, la más conocida, es su rol como metiltransferasa de histonas. Pero, como ya hemos mencionado anteriormente, también tiene la capacidad de metilar otras proteínas no histonas. Asimismo, G9a puede interactuar con otros factores proteicos y es capaz de modular la transcripción, independientemente de su capacidad catalítica.

En el último tiempo, G9a y su rol en la replicación y en la reparación del ADN ha despertado el interés de varios grupos de investigación. En particular, es importante destacar, el trabajo publicado en julio de 2017 por el grupo del Dr. Zhu (*Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research -Laboratory of Protein Posttranslational*

Modifications and Cell Function, Peking University Health Science Center, Beijing, China), que demuestra que G9a posee un rol activo en la reparación del daño al ADN. G9a se recluta a los sitios de daño e induce el cargado de RPA y Rad51, promoviendo de esta manera la reparación por recombinación homóloga (110). En línea con lo anterior, se sabe que, ante distintos tipos de estrés genotóxico, CRL4^{Cdt2} regula factores proteicos importantes en la replicación del ADN y la división celular, como CDT1 y Set8. En base a estas observaciones decidimos estudiar si la interacción de los complejos CRL4^{Cdt2} G9/GLP cumplía algún rol en los mecanismos de reparación del ADN.

Los inhibidores de topoisomerasas se utilizan para estudiar la respuesta al daño al ADN durante la replicación. En primer lugar, se decidió evaluar si en nuestro sistema, la utilización de CPT y VP16 (inhibidores de topoisomerasa) tenía algún efecto sobre los niveles de G9a y GLP en la cromatina. Si bien pudimos constatar que el uso de estas drogas genera daño al ADN (aumento de la fosforilación de γ H2AX, de p53 en la Serina 15 y de RPA), los niveles proteicos de G9a y GLP sobre la cromatina no se vieron alterados. Asimismo, el silenciamiento de Cdt2 tampoco tiene un efecto en los diferentes tratamientos (**Figura 42**).

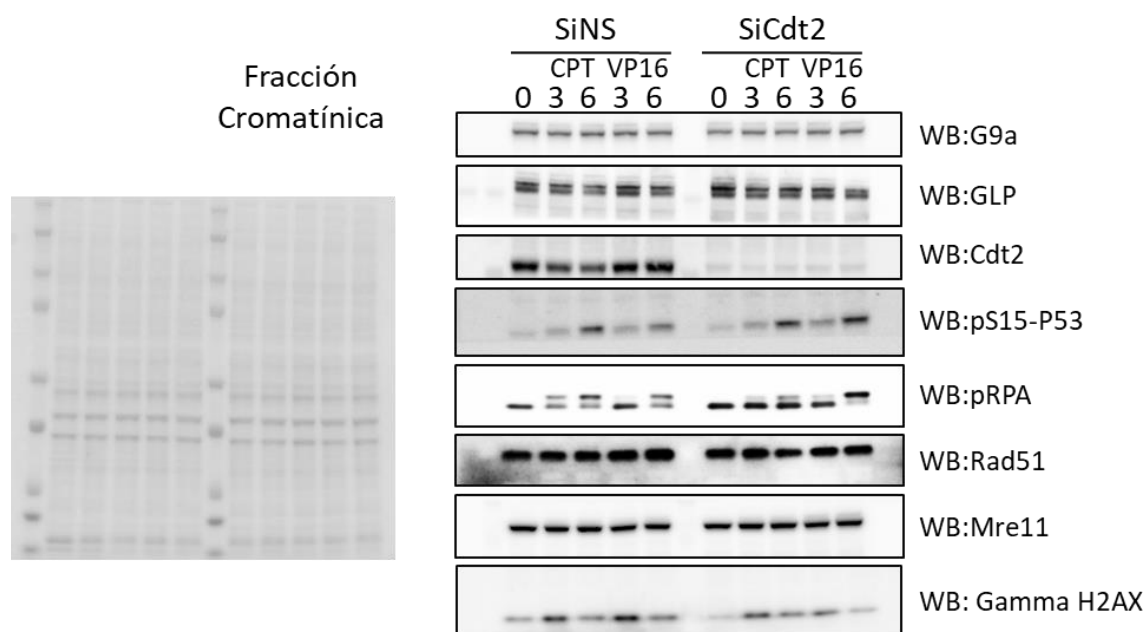


Figura 42. Evaluación de los niveles sobre la cromatina de G9a y GLP durante el daño al ADN. Las muestras fueron transfectadas con ARN de interferencia control (SiNS) o contra Cdt2 (SiCdt2). Como agentes causantes de daño al ADN se utilizó CPT y VP16 (inhibidores de topoisomerasa) en los tiempos indicados en la imagen. A la izquierda se observa la tinción con Ponceau que utilizamos como control de carga. Los Western Blot se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas detalladas en la imagen.

En la publicación del grupo del Dr. Zhu se demuestra que la fosforilación en la serina 211 de G9a es necesaria para su reclutamiento sobre la cromatina. En el contexto de nuestro proyecto, una hipótesis posible era que esta modificación post-traducciona modificara la capacidad de interacción de G9a con la E3 ligasa CRL4^{Cdt2}. En este sentido, se decidió verificar si versiones mutantes de G9a en este residuo alteraban su capacidad de interacción con Cdt2. Se utilizaron dos mutantes que tienen una sustitución en la posición 211, uno de ellos contiene una alanina que no se puede fosforilar, S211A, el otro mutante, S211D, tiene una sustitución que mimetiza la fosforilación. En experimentos de co-inmunoprecipitación se observó que ambos mutantes podían co-inmunoprecipitar Cdt2 de manera similar (**Figura 43**).

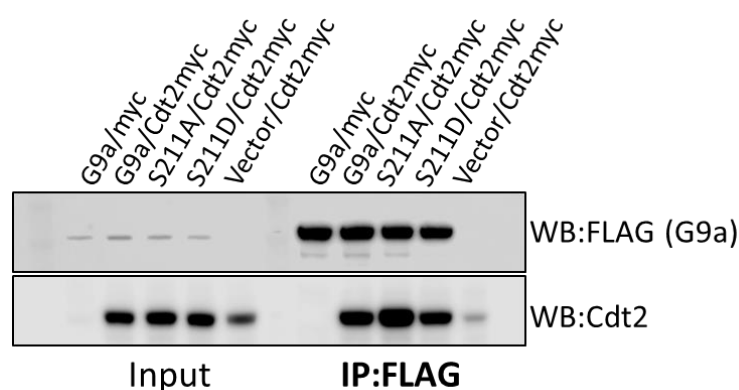


Figura 43. Cdt2 interactúa de forma similar con los mutantes de G9a S211A y S211D. Las células Hek293T fueron transfectadas con: una construcción que expresa Cdt2myc o un vector vacío (myc) en combinación con las diferentes construcciones de G9a y sus mutantes, o un vector vacío FLAG (Vector). Se realizó la inmunoprecipitación (IP: FLAG) de G9a y sus mutantes. A la izquierda se encuentran los lisados celulares totales. Los *Western Blot* se revelaron con anticuerpos específicos para la proteína Cdt2 y contra los tag FLAG (G9a).

Asimismo, decidimos evaluar si la fosforilación de G9a tenía algún efecto en la vida media de esta proteína. En línea con lo anterior, no se observó que los niveles proteicos de los mutantes se encontraran afectados por la disminución de Cdt2 en ambas fracciones analizadas (**Figura 44**).

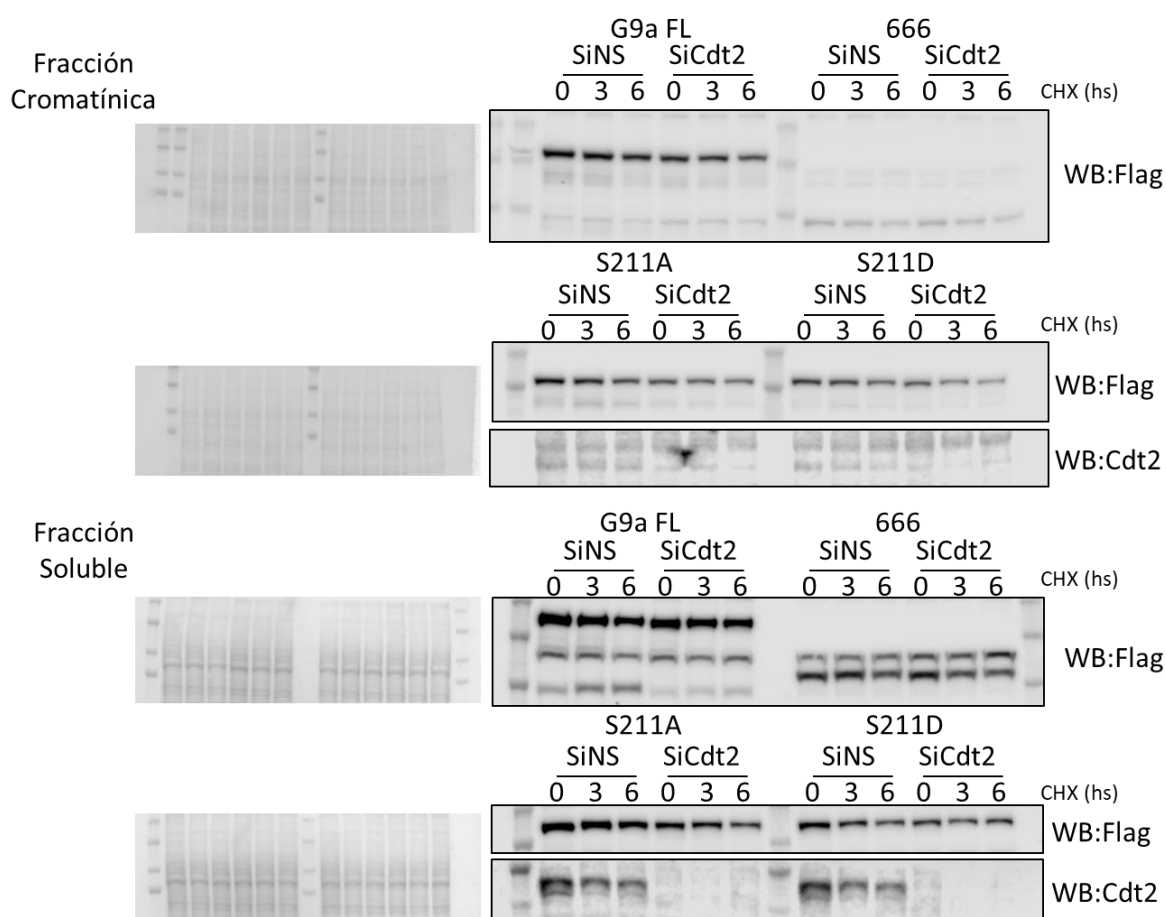


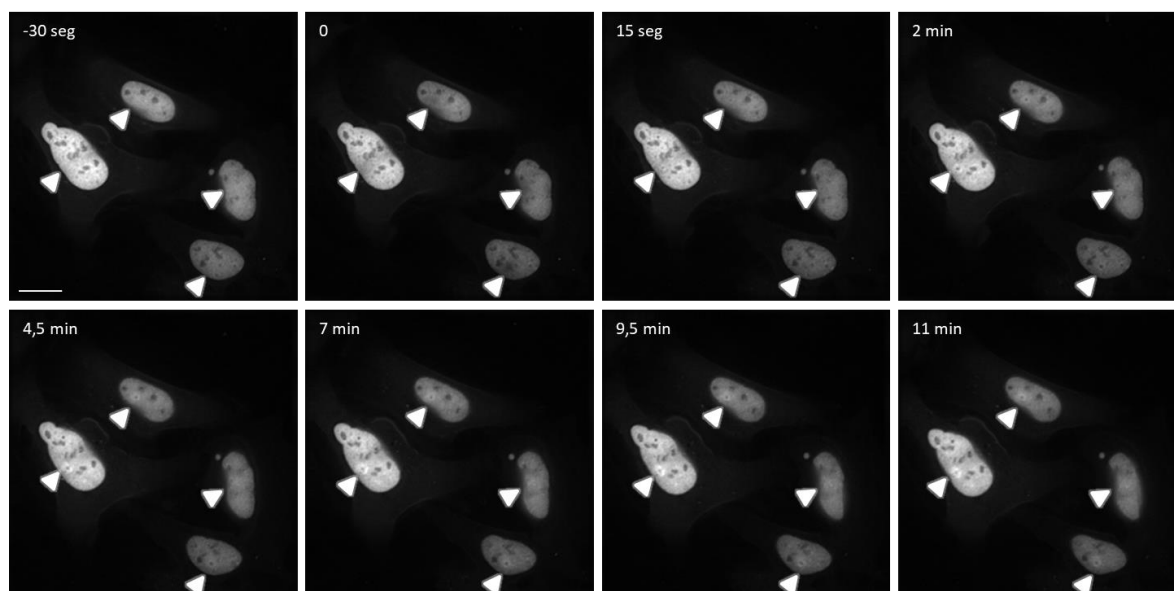
Figura 44. Efecto de la reducción de Cdt2 en la vida media de los mutantes de G9a (S211A y S211D). Las muestras fueron transfectadas con ARN de interferencia control (SiNS) y contra Cdt2 (SiCdt2), y posteriormente con G9a o sus versiones mutantes, S211A y S211D, y el mutante 666, que no tiene la capacidad de interactuar con Cdt2. Las muestras fueron separadas en dos fracciones (Soluble y Cromatínica). Los tiempos de tratamiento se detallan en la imagen. Los *Western Blot* se revelaron con anticuerpos específicos contra las proteínas detalladas en la imagen y el tag Flag que reconoce las construcciones de G9a sobre-expresada.

Pese a que en condiciones de estrés genotóxico no observamos cambios en los niveles proteicos globales de G9a y GLP asociados a la cromatina, decidimos generar daño al ADN en una región puntual y evaluar el reclutamiento de G9a. Para llevar a cabo estos experimentos se utilizó un microscopio de fluorescencia que contenía un sistema de *live imaging*.

A este fin, generamos una línea celular que expresa GFP-G9a de manera estable. Utilizando esta línea se comprobó que, efectivamente, esta proteína se recluta a los sitios de daño. Una vez realizada esta puesta a punto, se evaluó si este reclutamiento se veía afectado por el silenciamiento de Cdt2. Para evitar el estrés que se genera al silenciar Cdt2 de manera prolongada, se realizó la transfección del ARN de interferencia 30 horas antes del experimento, y los niveles de expresión de la proteína fueron evaluados mediante *Western*

Blot (Figura 46B). La línea que expresa Cdt2 de manera inducible descrita anteriormente no pudo utilizarse para estos experimentos debido a que el vector pLL3.7 contiene GFP en su secuencia, y las células expresan GFP constitutivamente.

SiNS



SiCdt2

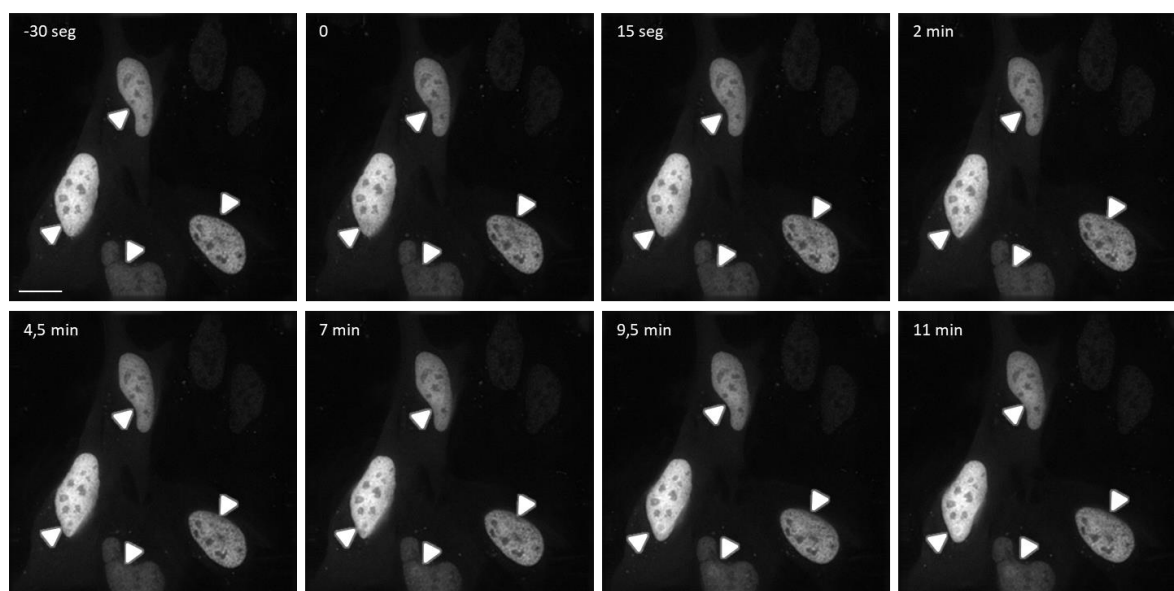


Figura 45. Análisis del reclutamiento de G9a a los sitios de daño al ADN. El silenciamiento de Cdt2 disminuye el reclutamiento de G9a a los sitios de daño. La línea celular que expresa G9a-GFP fueron transfectadas con ARN de interferencia control (SiNS) y contra Cdt2 (SiCdt2). Fueron sensibilizadas con BrdU y se analizó el reclutamiento de la proteína luego de irradiar una región del núcleo con un láser de 405 nm. Las regiones irradiadas se señalan con las puntas blancas en cada foto. El tiempo de cada imagen está indicado.

Como puede observarse en las imágenes de la **Figura 45**, cuando los niveles proteicos de Cdt2 disminuyen (SiCdt2), la intensidad de fluorescencia (debida al reclutamiento de G9a) en los sitios irradiados (marcados en cada célula) es menor que los sitios irradiados en el control (SiNS). Esto es indicativo de que CRL4^{Cdt2} cumple un rol importante en el reclutamiento de G9a a los sitios de daño al ADN. La **Figura 46A** muestra la cuantificación del reclutamiento de G9a luego del fotoblanqueo.

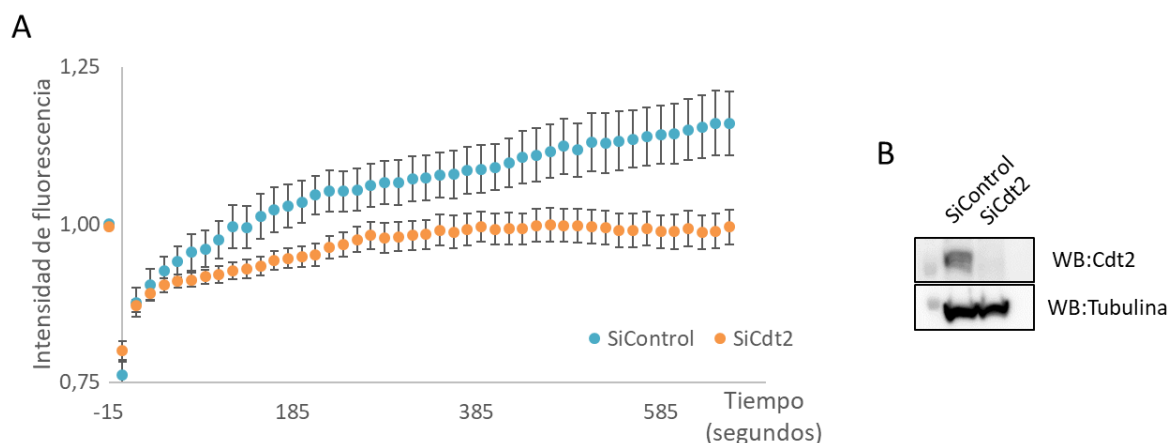


Figura 46. El silenciamiento de Cdt2 disminuye el reclutamiento de G9a a los sitios de daño. (A) Cuantificación del reclutamiento, determinado por la intensidad de fluorescencia luego del fotoblanqueo a medida que pasa el tiempo. (B) Análisis de los niveles de expresión de Cdt2 evaluados por *Western Blot*.

Con este último experimento se evidenció que el silenciamiento de Cdt2 tiene un efecto en el reclutamiento de G9a a los sitios de daño al ADN. Este resultado, si bien es preliminar y más experimentos son necesarios, nos presenta un buen escenario biológico donde estudiar la importancia de esta interacción.

DISCUSIÓN

Conclusiones

- Mediante una inmunoprecipitación en tándem seguida de una espectrometría de masa, se logró purificar Cdt2 en la fracción cromatínica y se identificó al complejo formado por G9a/GLP/ZNF644 y WIZ como interactor de este receptor de sustratos. Tanto la E3 ligasa CRL4^{Cdt2}, como G9a/GLP/ZNF644 y WIZ, se encuentran asociados a las horquillas de replicación.
- No fuimos capaces de determinar con exactitud el *degron* de G9a que nos hubiese permitido generar versiones mutantes de G9a incapaces de unirse con CRL4^{Cdt2}. Por lo tanto, intentamos determinar cuál era la región de interacción de Cdt2 con G9a. Se pudo comprobar que la metiltransferasa interactúa con los dominios WD40 de Cdt2, estructura clave en la interacción con sus sustratos. Sin embargo, no se pudo determinar la región de interacción en Cdt2 con mayor precisión, debido a que se sabe que cualquier tipo de mutación en estos dominios provoca cambios estructurales profundos.
- En experimentos con cicloheximida, utilizando ARN de interferencia o una línea que expresa Cdt2 de manera inducible, se determinó que CRL4^{Cdt2} no regula los niveles proteicos totales de G9a/GLP/ZNF644 y WIZ en la fracción cromatínica. Sin embargo, no podemos descartar que sólo una pequeña fracción de alguno de los componentes del complejo G9a/GLP/ZNF644/WIZ se encuentre regulado por la E3 ligasa bajo alguna condición determinada.
- G9a y GLP se desplazan desde la fracción soluble a la cromatínica a medida que transcurre el ciclo celular. Sin embargo, estas metiltransferasas no se degradan en la fase S del ciclo como los sustratos ya descritos de CRL4^{Cdt2}.
- Aunque se pudo comprobar que los componentes del complejo formado por G9a/GLP/ZNF644 y WIZ están poliubiquitinados, esta modificación no está afectada por la concentración de Cdt2. Sin embargo, no se puede descartar que CRL4^{Cdt2} medie la monoubiquitinación de alguna de estas proteínas o que la poliubiquitinación suceda como respuesta a un estímulo determinado.
- Se generaron líneas celulares que no expresan G9a y GLP mediante la técnica de CRISPR/Cas9.

- Debido a que G9a puede metilar proteínas no histonas, se realizó un análisis de las modificaciones post-traduccionales de Cdt2 utilizando las líneas que no expresan G9a y GLP antes descritas. Los resultados obtenidos demuestran que no existen péptidos de Cdt2 diferencialmente metilados en las distintas líneas analizadas. Sin embargo, es importante mencionar que se requieren estudios adicionales y más detallados para obtener una respuesta más sólida y definitiva.
- Se encontró que el reclutamiento de G9a a los sitios de daño generados mediante micro irradiaciones disminuye cuando Cdt2 está silenciado. En este sentido, se han obtenido resultados preliminares muy alentadores. Esperamos que en estudios posteriores podamos ahondar más en la caracterización molecular del eje CRL4^{Cdt2}/G9a y la función que cumple en el control de la integridad genómica.

Dr. Mario Rossi

Lic. Juliana Haydeé Enriqu  Steinberg

Discusión

La ubiquitinación de proteínas cumple un rol central en el control de la homeostasis celular y, en este sentido, está ampliamente demostrado que alteraciones en esta vía pueden contribuir a la transformación oncogénica de las células (87, 144). Dentro del grupo de las E3 ligasas, CRL4^{Cdt2} se destaca como un regulador fundamental del ciclo celular y de la proliferación celular que también cumple un rol importante en el proceso de reparación del ADN. Por lo tanto, no es sorprendente que los componentes del complejo CRL4^{Cdt2} se encuentren sobre-expresados en varios tipos de tumores, y que sus niveles de expresión se correlacionen con el tamaño tumoral, la presencia de metástasis y una baja supervivencia de los pacientes (93-97, 129, 145, 146). Con el fin de identificar nuevos interactores que nos ayuden a comprender los mecanismos moleculares por los cuales CRL4^{Cdt2} ejerce su actividad oncogénica, se realizó una purificación de Cdt2 sobre-expresado en diferentes condiciones y posteriormente se analizó por espectrometría de masa.

El enfoque experimental utilizado se diseñó teniendo en cuenta que la mayoría de los sustratos hasta ahora descritos de la E3 ligasa CRL4^{Cdt2} deben asociarse a la cromatina para interactuar con Cdt2 (51, 52, 138). Para aumentar las posibilidades de detectar sustratos de esta E3 ligasa, se utilizó un inhibidor de proteosoma o un inhibidor indirecto de las cullinas. Además, debido a que CRL4^{Cdt2} cumple un rol importante durante la reparación del daño al ADN se realizaron purificaciones a partir de células tratadas con distintos agentes genotóxicos, (74, 76, 147, 148). En este sentido, no se identificó ningún interactor que se asociara a Cdt2 de manera específica en respuesta al daño.

El análisis de los resultados obtenidos demuestra que, a través del procedimiento de purificación utilizado, logramos un enriquecimiento específico de interactores de Cdt2 en la fracción cromatínica. Si bien no fuimos capaces de purificar ninguno de los sustratos conocidos de CRL4^{Cdt2}, es importante destacar que este fenómeno se verificó en distintos casos en los cuales se utilizó con éxito esta metodología en el pasado para la identificación de nuevos sustratos de otras E3 ligasas (54).

Una vez identificados los interactores obtenidos de las purificaciones sobre la cromatina, los mismos se ordenaron teniendo en cuenta su frecuencia relativa en las

distintas condiciones analizadas. Cuando se procedió con el estudio de los candidatos mejor posicionados en el orden de mérito generado, los primeros cuatro representaban proteínas que se asocian a moléculas de ARN. Si bien eran los más abundantes en nuestras purificaciones decidimos no focalizar nuestra atención en ellos debido a que Cdt2 posee en su estructura dominios WD40, que también pueden mediar la asociación a moléculas de ARN (134, 138). Por lo tanto, la purificación de estos factores en las inmunoprecipitaciones de Cdt2 podía representar un artefacto de la sobre-expresión de este último.

El gen que seguía en la lista de interactores identificados era Ehmt1, que codifica para la proteína GLP, y entre los primeros 12 candidatos también se encontraba Ehmt2, que expresa la proteína G9a. Ambas proteínas tienen la capacidad de heterodimerizar y forman un complejo catalítico activo en las células, responsable de la metilación de la histona 3 en la lisina 9 (103, 105). Esta marca epigenética importante para la organización de la heterocromatina está relacionada con el silenciamiento transcripcional y la diferenciación celular (100). G9a y GLP son proteínas muy grandes, de 1210 y 1298 aminoácidos, respectivamente (149, 150), y en su secuencia se han identificado diferentes dominios estructurales con distintas funciones. G9a y GLP interactúan a través de sus dominios SET que se localizan cerca del N-terminal. Contienen además dominios de repetición de Anquirinas en tándem, mediante los cuales reconocen y se unen preferencialmente a la lisina 9 mono o dimetilada de la Histona 3 (104, 151). Asimismo se ha identificado también cerca del N-terminal de las metiltransferasas un dominio de activación de la transcripción (106).

Está ampliamente demostrado que la vía de ubiquitinación participa activamente de la regulación de los factores responsables de la modificación post-traducciona de las histonas, y que esta interacción funcional es crítica para el mantenimiento de la homeostasis celular. En particular, se sabía que la ligasa formada por la Cullina 4 y DDB1 regulaba, en modo indirecto, la metilación de histonas. Además y en línea con lo anterior, existían evidencias de que la inactivación de la Cullina 4 y de DDB1 inhibían la trimetilación de la Histona 3 en la lisina 9 y la 27, aunque no se conocía cuál era el receptor de sustrato involucrado (83). Asimismo, entre los sustratos conocidos de CRL4^{Cdt2} se encuentran otras proteínas encargadas de la remodelación y la reorganización de la cromatina, como Set8, TGD, MMSET (72-74, 76-79). Por lo tanto, en base a todas estas observaciones era de

esperar que la interacción de Cdt2 con G9a y GLP tuviera un rol importante en procesos asociados a la regulación de la duplicación y control de la expresión génica.

Por otro lado, distintas evidencias experimentales demostraban que en distintos tipos de cáncer los niveles de G9a y GLP se encuentran desregulados, y la sobre-expresión de estas, al igual que la de los componentes del complejo CRL4^{Cdt2}, se asocia a fenotipos de cáncer más agresivos (117, 118, 152-157). En este sentido, se ha reportado que el silenciamiento de G9a inhibe la proliferación en distintas líneas celulares (158, 159). Además se ha observado que la expresión de G9a y GLP es necesaria para el mantenimiento del fenotipo maligno, poniendo de manifiesto su alto potencial como un posible blanco para la intervención terapéutica en cáncer (113).

Una vez seleccionados G9a y GLP como posibles candidatos, se validó la interacción entre Cdt2 y G9a y GLP a través de ensayos de co-inmunoprecipitación en la fracción cromatínica.

Como se ha descrito anteriormente, una E3 ligasa puede regular la ubiquitinación de varios sustratos. Asimismo, numerosos estudios han identificado proteínas que son sustrato de diferentes E3 ligasas. En línea con lo anterior, dos grupos independientes han reportado mecanismos mediante los cuales diferentes E3 ligasas regulan los niveles de G9a y GLP. Por un lado, en células senescentes, la E3 ligasa APC/C^{Cdh1} (que pertenece a la misma clase de E3 ligasas que CRL4^{Cdt2}) induce la degradación proteosomal de G9a y GLP en respuesta al daño del ADN (136). En coincidencia con lo antes descrito, otro sustrato de la E3 ligasa CRL4^{Cdt2}, Set8, también es regulada por la misma E3 ligasa, APC/C^{Cdh1}, durante la fase G1 del ciclo celular (70). Asimismo, se ha demostrado que la E3 ligasa pVHL está también involucrada en la regulación de G9a. En condiciones de normoxia, un pequeño *pool* de G9a se hidroxila en residuos específicos de prolina y es ubiquitinada por pVHL para su degradación proteosomal. En hipoxia, este *pool* de G9a no puede ser hidroxilado, se estabiliza y aumenta su reclutamiento a la cromatina para contribuir a la represión específica de ciertos genes (111, 112).

El objetivo de este trabajo consistía en evidenciar el fenotipo ocasionado por la regulación de los sustratos identificados por parte de la E3 ligasa CRL4^{Cdt2}. A este fin se

debían generar versiones mutantes de los interactores seleccionados, G9a y GLP, insensibles a la acción de la E3 ligasa CRL4^{Cdt2}. Por lo tanto, el paso siguiente en la caracterización funcional consistió en delimitar la región de interacción de G9a con Cdt2 (*degron*). El grupo del Dr. Eiji Hara, nos facilitó las construcciones de G9a con las que comenzamos la identificación del posible *degron* de la metiltransferasa reconocido por CRL4^{Cdt2} (136). En un primer momento, utilizando las construcciones que expresan G9a *full lenght* y versiones mutantes de delección de esta proteína antes mencionadas se identificó una región de G9a involucrada en la interacción con Cdt2 (entre los aminoácidos 425-685). Sin embargo, cuando se procedió con la sustitución de residuos específicos en el contexto de la proteína completa no fue posible encontrar un mutante de G9a que no interactuara con Cdt2. Una posible explicación de estos resultados es que la generación de mutantes de delección con codones de *stop* genera cambios conformacionales profundos en la estructura tridimensional de la proteína G9a que impiden su asociación con Cdt2. Una alternativa era construir una versión mutante de G9a en la cual se hubiera eliminado la región 425 a 685. Sin embargo, considerando los resultados contradictorios que obtuvimos en el proceso de mapeo del *degron* en G9a no podíamos estar seguros de la validez de los resultados que obtendríamos con esa versión mutante. Por lo tanto, a pesar de que se abordaron numerosas estrategias diferentes con el fin de identificar el *degron* en G9a, ninguna de ellas nos permitió delimitar la mínima región de G9a necesaria para la interacción con Cdt2. En este sentido, no podemos descartar que la interacción entre estas proteínas este modulada por alguna modificación post-traducciona, y que las mutaciones generadas en G9a interfieran con esos procesos.

Las dificultades que se presentaron en nuestro trabajo durante la identificación del *degron* de G9a se corresponden con datos publicados por otros grupos de investigación. En el caso particular de la E3 ligasa APC/C^{Cdh1} citado anteriormente, los autores no pudieron determinar con exactitud el dominio de G9a y GLP necesario para la interacción con el receptor de sustratos Cdh1 (136). En línea con lo anterior, otros grupos de investigación reportaron resultados contradictorios en sus intentos por determinar la región mediante la cual G9a se une con otros factores proteicos (110, 160).

Para sortear estas dificultades que encontramos durante la identificación de la región de interacción de G9a con Cdt2, intentamos determinar cuál era la región de Cdt2

que mediaba la unión con G9a. Nuestros resultados mostraron que G9a interactúa con los dominios WD40 de Cdt2. Estos forman una plataforma mediante la cual Cdt2 se une a sus sustratos y por lo tanto era un dato alentador que respaldaba nuestra hipótesis de que existía una interacción funcional entre los complejos CRL4^{Cdt2} y G9a/GLP. Sin embargo, no fue posible continuar con la identificación de una región mínima de interacción en Cdt2, debido a que está ampliamente aceptado que mutaciones en los aminoácidos que forman parte de estos dominios alteraran su estructura tridimensional.

En 2015, dos grupos de investigación demostraron que el complejo formado por G9a y GLP interactuaba con ZNF644 y WIZ para asociarse a la cromatina, y que todo el complejo se encuentra asociado a los centros de replicación (106, 107). Basándonos en estas evidencias, realizamos un nuevo análisis de la lista generada con los datos obtenidos de nuestras purificaciones de Cdt2, y verificamos que ZNF644 y WIZ, al igual que G9a y GLP, estaban presentes dentro de los primeros 12 posibles interactores de Cdt2. En base a estos resultados decidimos ampliar nuestra caracterización a todos los miembros de este complejo multiproteico. En este sentido, nuestros resultados demostraron que CRL4^{Cdt2} se asocia efectivamente a todo el complejo formado por G9a/GLP/ZNF644 y WIZ, sugiriendo que esta interacción posiblemente posea un significado funcional importante en la regulación de procesos relacionados con la replicación y la reparación del ADN. Asimismo, a partir del análisis detallado de los datos crudos del trabajo antes citado, se confirmó que Cdt2 estaba presente en los centros de replicación y que los niveles de Cdt2 se correlacionan con los de los componentes del complejo antes mencionado (107).

Basándonos en estos últimos resultados, no podemos descartar que Cdt2 interactúe con G9a y GLP a través de ZNF644 o WIZ, y en este sentido estamos generando las herramientas necesarias para poder estudiarlo.

Si bien no pudimos identificar la región de interacción entre Cdt2 y G9a, decidimos evaluar si CRL4^{Cdt2} regulaba la ubiquitinación y la vida media de alguno de los miembros del complejo formado por G9a/GLP/ZNF644 y WIZ. A este fin utilizamos distintas metodologías, y nuestros resultados indican que variaciones en los niveles de Cdt2 no producen cambios en los niveles de poliubiquitinación y estabilidad de ninguna de las proteínas de complejo. Sin embargo, no podemos descartar que ante un estímulo determinado CRL4^{Cdt2} regule

algún miembro de este complejo en modo similar a lo observado por otros grupos de investigación (112, 136).

Teniendo en cuenta que el silenciamiento prolongado de Cdt2 tiene efectos negativos en las células, no se pudieron realizar experimentos para determinar si la reducción de los niveles de Cdt2 afecta la poliubiquitinación de G9a/GLP/ZNF644 y WIZ. Dichos experimentos tampoco se podían llevar a cabo en la línea celular que expresa Cdt2 de manera inducible, debido a que la construcción expresa una versión de Cdt2 etiquetada con FLAG e inmunoprecipitaría junto con el vector TR-TUBE que se utiliza para estudiar el proceso de poliubiquitinación. Actualmente estamos generando nuevas herramientas para sobreponernos a estas complicaciones.

Como se comentó anteriormente, la regulación de la mayoría de los sustratos de CRL4^{Cdt2} caracterizados sucede cuando están asociados a la cromatina, durante la fase S del ciclo celular (138). Por lo tanto, decidimos evaluar los niveles proteicos de G9a y GLP a lo largo del ciclo celular. Si bien observamos que los niveles proteicos de G9a y GLP aumentan durante la fase G1 del ciclo celular sobre la cromatina, estos se mantienen estables durante la progresión hacia la fase S del ciclo celular. Estos resultados están en línea con nuestras observaciones que indican que la interacción entre CRL4^{Cdt2} y G9a/GLP no promueve su poliubiquitinación y degradación proteosomal.

Entre las funciones de G9a conocidas, se sabe que tiene la capacidad de autometilarse en la lisina 239, creando un sitio de unión para HP1 (101, 161). También puede metilar otras proteínas, entre las que se encuentran descritas CDYL1, WIZ y ACINUS. Este tipo de modificación post traduccional de sustratos no histónicos tiene un rol fundamental también en la regulación de la transcripción génica. Se ha descrito también que G9a puede metilar a *Reptin* y *Pontin*, dos factores remodeladores de la cromatina que se encargan de modular la actividad transcripcional de HIF1 α en condiciones de hipoxia (162, 163). En línea con lo anterior, G9a regula a través de la metilación de p53 su actividad como factor de transcripción (164). Asimismo, recientemente, un trabajo demostró que G9a y GLP posee la capacidad de metilar la Ligasa de ADN 1 (LIG1). Esta modificación incrementa la capacidad de LIG1 de interactuar con la E3 ligasa UHRF1 y lo recluta a los sitios de replicación para promover la metilación del ADN (165). Este trabajo también demuestra que

existe una regulación coordinada entre la replicación del ADN, la metilación y el ensamblado de la cromatina (166, 167).

Teniendo en consideración estas observaciones, y que en nuestras condiciones experimentales CRL4^{Cdt2} no afectaba los niveles proteicos de G9a y GLP, decidimos entonces evaluar si Cdt2 era un sustrato de la actividad metiltransferasa de G9a y GLP. El análisis de resultados obtenidos nos indica que Cdt2 no puede funcionar como sustrato de metilación de G9a y GLP. Sin embargo, nuestros experimentos no fueron concluyentes en este sentido y no podemos descartar la posibilidad de que G9a y GLP modulen la actividad de CRL4^{Cdt2}. En este sentido planeamos utilizar otra forma de analizar si Cdt2 se encuentra modificado post-traduccionalmente por las metiltransferasas G9a/GLP. Esta metodología consiste en mutar los péptidos RK y evaluar la capacidad de interacción de Cdt2 con G9a/GLP, así como también, la capacidad catalítica de estos mutantes en distintas condiciones.

Si bien ya se sabía que G9a y GLP cumplen una función importante en el ensamblado de la cromatina, así como también, la relación de este complejo con la replicación (108, 160), en el último tiempo, ha despertado el interés de varios grupos de investigación el rol que posee G9a en la reparación del ADN (110, 168). En este sentido trabajos publicados en 2017 postulan que el uso de inhibidores específicos de esta metiltransferasa promueve la muerte de las células cancerígenas evitando la reparación del daño al ADN, aunque no está caracterizado en detalle el rol que G9a cumple durante este proceso (114, 119, 169). En este sentido, más recientemente, otro grupo de investigación ha logrado definir la función que posee G9a en situaciones que causan estrés genotóxico. En particular se ha demostrado que ante un estímulo que causa daño al ADN, G9a es fosforilado por la quinasa CK2, y se recluta a los sitios de daño. Una vez reclutado, G9a interactúa con RPA y permite la formación de focos RPA-Rad51 que intervienen en la reparación del ADN por recombinación homóloga (110). En línea con lo anterior, recientemente otros trabajos comprueban que GLP también se recluta a los sitios de daño durante la reparación del ADN (168). Teniendo en cuenta los datos antes comentados, y que además existe evidencia que respalda la importancia de la E3 ligasa CRL4^{Cdt2} en la regulación de distintos factores proteicos durante la reparación del ADN (58-60, 137), la reparación del daño al ADN podría representar un potencial escenario biológico donde la interacción entre G9a/GLP y Cdt2 puede cumplir un rol fundamental.

A partir de estos datos, decidimos evaluar los niveles proteicos de G9a y GLP en experimentos con agentes inhibidores de topoisomerasa, que causan daño al ADN en las células que están replicando su genoma. Si bien un primer análisis de los niveles totales de G9a y GLP en la fracción cromatínica no mostró cambios en los distintos tratamientos, resultados preliminares muy alentadores nos sugieren que puede existir un mecanismo mediante el cual G9a y Cdt2 estén trabajando de manera conjunta en la respuesta al daño al ADN. En particular, mediante experimentos de microscopía, se evidenció que el silenciamiento de Cdt2 afecta el reclutamiento de G9a a los sitios donde se genera daño al ADN. Un rol conjunto de G9a y Cdt2 durante la reparación del ADN podría explicar el hecho de que ambas proteínas estén sobre-expresadas en diferentes tipos de cáncer.

Debido a que los estudios de otros grupos de investigación vinculan a G9a con la reparación del daño al ADN por recombinación homóloga, que tiene específicamente lugar durante la fase S del ciclo celular, estamos generando herramientas que nos permitan identificar y trabajar en células que estén activamente replicando el ADN. En este sentido estamos desarrollando momento una línea celular que además de expresar GFP-G9a, tiene incorporado una construcción que expresa *mPlum*-PCNA, un marcador que cambia su distribución subcelular según la fase del ciclo celular en que se encuentran las células analizadas.

Por último, el control de la salida del ciclo celular puede representar otro escenario biológico en el cual la interacción entre G9a/GLP y Cdt2 posea un rol importante. En este sentido, existen evidencias de que por un lado la degradación de Cdt2 dependiente de la E3 ligasa SCF^{FBXO11} es necesaria para la salida del ciclo celular (54). De hecho, si se inhibe la degradación de Cdt2 y sus niveles se estabilizan, la salida del ciclo se ve retrasada. Por otro lado, un estudio reciente demuestra que G9a cumple un rol de suma importancia en la regulación de la proliferación y la diferenciación celular en los mioblastos. Una de las características de las células diferenciadas, es que se arrestan y pierden la capacidad de proliferar (170). En el trabajo citado anteriormente, los autores demuestran que el aumento en los niveles de G9a (al igual que el aumento de los niveles de Cdt2) bloquea la salida del ciclo celular e incrementa la proliferación, debido a que G9a interactúa con E2F1/PCAF activando la transcripción de genes específicos, e inhibiendo la transcripción de genes diana de MyoD, importantes para la diferenciación (171).

BIBLIOGRAFÍA

1. Ciechanover, A. (2015) The unravelling of the ubiquitin system, *Nature reviews. Molecular cell biology* 16, 322-324.
2. Chau, V., Tobias, J., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D., Gonda, D., and Varshavsky, A. (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein, *Science* 243, 1576-1583.
3. Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P. P., and Dikic, I. (2003) Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation, *Nat Cell Biol* 5, 461.
4. Staub, O., Gautschi, I., Ishikawa, T., Breitschopf, K., Ciechanover, A., Schild, L., and Rotin, D. (1997) Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination, *EMBO J* 16, 6325-6336.
5. Koepp, D. M., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (1999) How the Cyclin Became a Cyclin: Regulated Proteolysis in the Cell Cycle, *Cell* 97, 431-434.
6. Jin, L., Williamson, A., Banerjee, S., Philipp, I., and Rape, M. (2008) Mechanism of Ubiquitin-Chain Formation by the Human Anaphase-Promoting Complex, *Cell* 133, 653-665.
7. Davies, A. A., Huttner, D., Daigaku, Y., Chen, S., and Ulrich, H. D. (2008) Activation of Ubiquitin-Dependent DNA Damage Bypass Is Mediated by Replication Protein A, *Mol Cell* 29, 625-636.
8. Wu, L., Li, L., Zhou, B., Qin, Z., and Dou, Y. (2014) H2B Ubiquitylation Promotes RNA Pol II Processivity via PAF1 and pTEFb, *Mol Cell* 54, 920-931.
9. Gudjonsson, T., Altmeyer, M., Savic, V., Toledo, L., Dinant, C., Grøfte, M., Bartkova, J., Poulsen, M., Oka, Y., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Neumann, B., Heriche, J.-K., Shearer, R., Saunders, D., Bartek, J., Lukas, J., and Lukas, C. (2012) TRIP12 and UBR5 Suppress Spreading of Chromatin Ubiquitylation at Damaged Chromosomes, *Cell* 150, 697-709.
10. Yoshida, M., Yoshida, K., Kozlov, G., Lim, N. S., De Crescenzo, G., Pang, Z., Berlanga, J. J., Kahvejian, A., Gehring, K., Wing, S. S., and Sonenberg, N. (2006) Poly(A) binding protein (PABP) homeostasis is mediated by the stability of its inhibitor, Paip2, *EMBO J* 25, 1934-1944.
11. Zhi, X., Zhao, D., Wang, Z., Zhou, Z., Wang, C., Chen, W., Liu, R., and Chen, C. (2013) E3 Ubiquitin Ligase RNF126 Promotes Cancer Cell Proliferation by Targeting the Tumor Suppressor p21 for Ubiquitin-Mediated Degradation, *Cancer Res* 73, 385-394.
12. Xia, M., Liu, J., Wu, X., Liu, S., Li, G., Han, C., Song, L., Li, Z., Wang, Q., Wang, J., Xu, T., and Cao, X. (2013) Histone Methyltransferase Ash1l Suppresses Interleukin-6 Production and Inflammatory Autoimmune Diseases by Inducing the Ubiquitin-Editing Enzyme A20, *Immunity* 39, 470-481.
13. Tan, Z., Sun, X., Hou, F. y., Oh, H. w., Hilgenberg, L. G. W., Hol, E. M., van Leeuwen, F. W., Smith, M. A., O'Dowd, D. K., and Schreiber, S. S. (2007) Mutant ubiquitin found in Alzheimer's disease causes neuritic beading of mitochondria in association with neuronal degeneration, *Cell Death Differ* 14, 1721-1732.

14. Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system, *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.
15. Pickart, C. M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination, *Annu Rev Biochem* 70, 503-533.
16. Moudry, P., Lukas, C., Macurek, L., Hanzlikova, H., Hodny, Z., Lukas, J., and Bartek, J. (2012) Ubiquitin-activating enzyme UBA1 is required for cellular response to DNA damage, *Cell Cycle* 11, 1573-1582.
17. Gavin, J. M., Chen, J. J., Liao, H., Rollins, N., Yang, X., Xu, Q., Ma, J., Loke, H. K., Lingaraj, T., Brownell, J. E., Mallender, W. D., Gould, A. E., Amidon, B. S., and Dick, L. R. (2012) Mechanistic studies on activation of ubiquitin and di-ubiquitin-like protein, FAT10, by ubiquitin-like modifier activating enzyme 6, Uba6, *J Biol Chem* 287, 15512-15522.
18. Lee, I., and Schindelin, H. (2008) Structural Insights into E1-Catalyzed Ubiquitin Activation and Transfer to Conjugating Enzymes, *Cell* 134, 268-278.
19. Metzger, M. B., Hristova, V. A., and Weissman, A. M. (2012) HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance, *J Cell Sci* 125, 531-537.
20. Clague, M. J., Coulson, J. M., and Urbe, S. (2012) Cellular functions of the DUBs, *J Cell Sci* 125, 277-286.
21. Nijman, S. M. B., Luna-Vargas, M. P. A., Velds, A., Brummelkamp, T. R., Dirac, A. M. G., Sixma, T. K., and Bernards, R. (2005) A Genomic and Functional Inventory of Deubiquitinating Enzymes, *Cell* 123, 773-786.
22. Komander, D., and Rape, M. (2012) The Ubiquitin Code, *Annual Review of Biochemistry* 81, 203-229.
23. Akutsu, M., Dikic, I., and Bremm, A. (2016) Ubiquitin chain diversity at a glance, *J Cell Sci* 129, 875-880.
24. Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C. M. (2000) *Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal*, EMBO J. 2000 Jan 4;19(1):94-102. doi:10.1093/emboj/19.1.94.
25. Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO, *Nature* 419, 135-141.
26. Spence, J., Sadis, S., Haas, A. L., and Finley, D. (1995) *A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination*, Mol Cell Biol. 1995 Mar;15(3):1265-73.
27. Kim, H. T., Kim, K. P., Lledias, F., Kisselev, A. F., Scaglione, K. M., Skowrya, D., Gygi, S. P., and Goldberg, A. L. (2007) Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages, *J Biol Chem* 282, 17375-17386.
28. Kirkpatrick, D. S., Hathaway, N. A., Hanna, J., Elsasser, S., Rush, J., Finley, D., King, R. W., and Gygi, S. P. (2006) Quantitative analysis of in vitro ubiquitinated cyclin B1 reveals complex chain topology, *Nat Cell Biol* 8, 700-710.

29. Ben-Saadon, R., Zaaroor, D., Ziv, T., and Ciechanover, A. (2006) The polycomb protein Ring1B generates self atypical mixed ubiquitin chains required for its in vitro histone H2A ligase activity, *Mol Cell* 24, 701-711.
30. Robzyk, K., Recht, J., and Osley, M. A. (2000) Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast, *Science* 287, 501-504.
31. Terrell, J., Shih, S., Dunn, R., and Hicke, L. (1998) A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor, *Mol Cell* 1, 193-202.
32. Kerscher, O., Felberbaum, R., and Hochstrasser, M. (2006) Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins, *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 159-180.
33. Cappadocia, L., and Lima, C. D. (2017) Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures, Chemistry, and Mechanism, *Chem Rev* 24.
34. Schwartz, D. C., and Hochstrasser, M. (2003) A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers, *Trends Biochem Sci* 28, 321-328.
35. Nalepa, G., Rolfe, M., and Harper, J. W. (2006) Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system, *Nature reviews. Drug discovery* 5, 596-613.
36. Berndsen, C. E., and Wolberger, C. (2014) New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism, *Nat Struct Mol Biol* 21, 301-307.
37. Vittal, V., Stewart, M. D., Brzovic, P. S., and Klevit, R. E. (2015) Regulating the Regulators: Recent Revelations in the Control of E3 Ubiquitin Ligases, *J Biol Chem* 290, 21244-21251.
38. Rotin, D., and Kumar, S. (2009) Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases, *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 398-409.
39. Lorenz, S. (2018) Structural mechanisms of HECT-type ubiquitin ligases, *Biol Chem* 399, 127-145.
40. Garcia-Gonzalo, F. R., and Rosa, J. L. (2005) The HERC proteins: functional and evolutionary insights, *Cell Mol Life Sci* 62, 1826-1838.
41. Spratt, D. E., Walden, H., and Shaw, G. S. (2014) RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions, *Biochem J* 458, 421-437.
42. Metzger, M. B., Pruneda, J. N., Klevit, R. E., and Weissman, A. M. (2014) RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination, *Biochim Biophys Acta* 1, 47-60.
43. Zimmerman, E. S., Schulman, B. A., and Zheng, N. (2010) *Structural assembly of cullin-RING ubiquitin ligase complexes*, *Curr Opin Struct Biol.* Dec;20(6):714-21. Epub 2010 Sep 27 doi:10.1016/j.sbi.2010.08.010.
44. Kamura, T., Conrad, M. N., Yan, Q., Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (1999) The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2, *Genes Dev* 13, 2928-2933.

45. Petroski, M. D., and Deshaies, R. J. (2005) Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases, *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 9-20.
46. Tang, Z., Li, B., Bharadwaj, R., Zhu, H., Özkan, E., Hakala, K., Deisenhofer, J., and Yu, H. (2001) APC2 Cullin Protein and APC11 RING Protein Comprise the Minimal Ubiquitin Ligase Module of the Anaphase-promoting Complex, *Mol Biol Cell*. Dec;12(12):3839-51.
47. Primorac, I., and Musacchio, A. (2013) Panta rhei: The APC/C at steady state, *J Cell Biol* 201, 177-189.
48. Abbas, T., and Dutta, A. (2011) CRL4Cdt2: master coordinator of cell cycle progression and genome stability, *Cell Cycle* 10, 241-249.
49. He, Y. J., McCall, C. M., Hu, J., Zeng, Y., and Xiong, Y. (2006) DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases, *Genes Dev*. Nov 1;20(21):2949-54. doi:10.1101/gad.1483206.
50. Angers, S., Li, T., Yi, X., MacCoss, M. J., Moon, R. T., and Zheng, N. (2006) Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery, *Nature* 443, 590-593.
51. Havens, C. G., and Walter, J. C. (2009) Docking of a specialized PIP Box onto chromatin-bound PCNA creates a degron for the ubiquitin ligase CRL4Cdt2, *Mol Cell* 35, 93-104.
52. Havens, C. G., Shobnam, N., Guarino, E., Centore, R. C., Zou, L., Kearsey, S. E., and Walter, J. C. (2012) Direct role for proliferating cell nuclear antigen in substrate recognition by the E3 ubiquitin ligase CRL4Cdt2, *J Biol Chem* 287, 11410-11421.
53. Huh, J., and Piwnica-Worms, H. (2013) CRL4(CDT2) targets CHK1 for PCNA-independent destruction, *Molecular and cellular biology* 33, 213-226.
54. Rossi, M., Duan, S., Jeong, Y. T., Horn, M., Saraf, A., Florens, L., Washburn, M. P., Antebi, A., and Pagano, M. (2013) Regulation of the CRL4(Cdt2) ubiquitin ligase and cell-cycle exit by the SCF(Fbxo11) ubiquitin ligase, *Mol Cell* 49, 1159-1166.
55. Nishitani, H., and Lygerou, Z. (2004) DNA replication licensing, *Front Biosci* 9, 2115-2132.
56. Evrin, C., Clarke, P., Zech, J., Lurz, R., Sun, J., Uhle, S., Li, H., Stillman, B., and Speck, C. (2009) A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20240-20245.
57. Gillespie, P. J., Li, A., and Blow, J. J. (2001) Reconstitution of licensed replication origins on Xenopus sperm nuclei using purified proteins, *BMC Biochem* 2, 15.
58. Jin, J., Arias, E. E., Chen, J., Harper, J. W., and Walter, J. C. (2006) A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1, *Mol Cell* 23, 709-721.
59. Sansam, C. L., Shepard, J. L., Lai, K., Ianari, A., Danielian, P. S., Amsterdam, A., Hopkins, N., and Lees, J. A. (2006) DTL/CDT2 is essential for both CDT1 regulation and the early G2/M checkpoint, *Genes Dev* 20, 3117-3129.

60. Higa, L. A., Banks, D., Wu, M., Kobayashi, R., Sun, H., and Zhang, H. (2006) L2DTL/CDT2 interacts with the CUL4/DDB1 complex and PCNA and regulates CDT1 proteolysis in response to DNA damage, *Cell Cycle* 5, 1675-1680.
61. Raman, M., Havens, C. G., Walter, J. C., and Harper, J. W. (2011) A genome-wide screen identifies p97 as an essential regulator of DNA damage-dependent CDT1 destruction, *Mol Cell* 44, 72-84.
62. Arias, E. E., and Walter, J. C. (2007) Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells, *Genes Dev* 21, 497-518.
63. Nishitani, H., Shiomi, Y., Iida, H., Michishita, M., Takami, T., and Tsurimoto, T. (2008) CDK inhibitor p21 is degraded by a proliferating cell nuclear antigen-coupled Cul4-DDB1Cdt2 pathway during S phase and after UV irradiation, *J Biol Chem* 283, 29045-29052.
64. Abbas, T., Sivaprasad, U., Terai, K., Amador, V., Pagano, M., and Dutta, A. (2008) PCNA-dependent regulation of p21 ubiquitylation and degradation via the CRL4Cdt2 ubiquitin ligase complex, *Genes Dev* 22, 2496-2506.
65. Kim, Y., Starostina, N. G., and Kipreos, E. T. (2008) *The CRL4(Cdt2) ubiquitin ligase targets the degradation of p21(Cip1) to control replication licensing*, *Genes Dev.* Sep 15;22(18):2507-19. doi:10.1101/gad.1703708.
66. Terai, K., Abbas, T., Jazaeri, A. A., and Dutta, A. (2010) CRL4(Cdt2) E3 ubiquitin ligase monoubiquitinates PCNA to promote translesion DNA synthesis, *Mol Cell* 37, 143-149.
67. Kim, S. H., and Michael, W. M. (2008) Regulated proteolysis of DNA polymerase eta during the DNA-damage response in *C. elegans*, *Mol Cell* 32, 757-766.
68. Shibutani, S. T., de la Cruz, A. F., Tran, V., Turbyfill, W. J., 3rd, Reis, T., Edgar, B. A., and Duronio, R. J. (2008) Intrinsic negative cell cycle regulation provided by PIP box- and Cul4Cdt2-mediated destruction of E2f1 during S phase, *Dev Cell* 15, 890-900.
69. Houston, S. I., McManus, K. J., Adams, M. M., Sims, J. K., Carpenter, P. B., Hendzel, M. J., and Rice, J. C. (2008) Catalytic function of the PR-Set7 histone H4 lysine 20 monomethyltransferase is essential for mitotic entry and genomic stability, *J Biol Chem* 283, 19478-19488.
70. Wu, S., Wang, W., Kong, X., Congdon, L. M., Yokomori, K., Kirschner, M. W., and Rice, J. C. (2010) Dynamic regulation of the PR-Set7 histone methyltransferase is required for normal cell cycle progression, *Genes Dev* 24, 2531-2542.
71. Yin, Y., Yu, V. C., Zhu, G., and Chang, D. C. (2008) SET8 plays a role in controlling G1/S transition by blocking lysine acetylation in histone through binding to H4 N-terminal tail, *Cell Cycle* 7, 1423-1432.
72. Abbas, T., Shibata, E., Park, J., Jha, S., Karnani, N., and Dutta, A. (2010) CRL4(Cdt2) regulates cell proliferation and histone gene expression by targeting PR-Set7/Set8 for degradation, *Mol Cell* 40, 9-21.
73. Centore, R. C., Havens, C. G., Manning, A. L., Li, J. M., Flynn, R. L., Tse, A., Jin, J., Dyson, N. J., Walter, J. C., and Zou, L. (2010) CRL4(Cdt2)-mediated destruction of the histone

- methyltransferase Set8 prevents premature chromatin compaction in S phase, *Mol Cell* 40, 22-33.
74. Jorgensen, S., Eskildsen, M., Fugger, K., Hansen, L., Larsen, M. S., Kousholt, A. N., Syljuasen, R. G., Trelle, M. B., Jensen, O. N., Helin, K., and Sorensen, C. S. (2011) SET8 is degraded via PCNA-coupled CRL4(CDT2) ubiquitylation in S phase and after UV irradiation, *J Cell Biol* 192, 43-54.
 75. Tardat, M., Brustel, J., Kirsh, O., Lefebvre, C., Callanan, M., Sardet, C., and Julien, E. (2010) The histone H4 Lys 20 methyltransferase PR-Set7 regulates replication origins in mammalian cells, *Nat Cell Biol* 12, 1086-1093.
 76. Oda, H., Hubner, M. R., Beck, D. B., Vermeulen, M., Hurwitz, J., Spector, D. L., and Reinberg, D. (2010) Regulation of the histone H4 monomethylase PR-Set7 by CRL4(Cdt2)-mediated PCNA-dependent degradation during DNA damage, *Mol Cell* 40, 364-376.
 77. Shibata, E., Dar, A., and Dutta, A. (2014) CRL4Cdt2 E3 ubiquitin ligase and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) cooperate to degrade thymine DNA glycosylase in S phase, *J Biol Chem* 289, 23056-23064.
 78. Slenn, T. J., Morris, B., Havens, C. G., Freeman, R. M., Jr., Takahashi, T. S., and Walter, J. C. (2014) Thymine DNA glycosylase is a CRL4Cdt2 substrate, *J Biol Chem* 289, 23043-23055.
 79. Evans, D. L., Zhang, H., Ham, H., Pei, H., Lee, S., Kim, J., Billadeau, D. D., and Lou, Z. (2016) MMSET is dynamically regulated during cell-cycle progression and promotes normal DNA replication, *Cell Cycle* 15, 95-105.
 80. Martin, C., and Zhang, Y. (2005) The diverse functions of histone lysine methylation, *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 838-849.
 81. Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001) Translating the histone code, *Science* 293, 1074-1080.
 82. Jia, S., Kobayashi, R., and Grewal, S. I. (2005) Ubiquitin ligase component Cul4 associates with Ctr4 histone methyltransferase to assemble heterochromatin, *Nat Cell Biol.* Oct;7(10):1007-13. doi: 10.1038/ncb1300. Epub 2005 Aug 28.
 83. Higa, L. A., Wu, M., Ye, T., Kobayashi, R., Sun, H., and Zhang, H. (2006) CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation, *Nat Cell Biol* 8, 1277-1283.
 84. Zhao, Y., Shen, Y., Yang, S., Wang, J., Hu, Q., Wang, Y., and He, Q. (2010) Ubiquitin ligase components Cullin4 and DDB1 are essential for DNA methylation in *Neurospora crassa*, *J Biol Chem* 285, 4355-4365.
 85. Kapetanaki, M. G., Guerrero-Santoro, J., Bisi, D. C., Hsieh, C. L., Rapic-Otrin, V., and Levine, A. S. (2006) The DDB1-CUL4ADDB2 ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2588-2593.
 86. Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H. Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xiong, Y., and Zhang, Y. (2006) Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage, *Mol Cell* 22, 383-394.

-
87. Kirkin, V., and Dikic, I. (2011) Ubiquitin networks in cancer, *Current opinion in genetics & development* 21, 21-28.
88. Dimopoulos, M. A., Richardson, P. G., Schlag, R., Khuageva, N. K., Shpilberg, O., Kastritis, E., Kropff, M., Petrucci, M. T., Delforge, M., Alexeeva, J., Schots, R., Masszi, T., Mateos, M. V., Deraedt, W., Liu, K., Cakana, A., van de Velde, H., and San Miguel, J. F. (2009) VMP (Bortezomib, Melphalan, and Prednisone) is active and well tolerated in newly diagnosed patients with multiple myeloma with moderately impaired renal function, and results in reversal of renal impairment: cohort analysis of the phase III VISTA study, *J Clin Oncol* 27, 6086-6093.
89. Jagannath, S., Richardson, P. G., Barlogie, B., Berenson, J. R., Singhal, S., Irwin, D., Srkalovic, G., Schenkein, D. P., Esseltine, D. L., and Anderson, K. C. (2006) Bortezomib in combination with dexamethasone for the treatment of patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma with less than optimal response to bortezomib alone, *Haematologica* 91, 929-934.
90. Goldberg, S. N. (2008) Can tumor growth be further inhibited by combining drugs such as bortezomib with image-guided interventional oncologic procedures?, *Radiology* 248, 323-325.
91. Bauer, S., Parry, J. A., Muhlenberg, T., Brown, M. F., Seneviratne, D., Chatterjee, P., Chin, A., Rubin, B. P., Kuan, S. F., Fletcher, J. A., Duensing, S., and Duensing, A. (2010) Proapoptotic activity of bortezomib in gastrointestinal stromal tumor cells, *Cancer Res* 70, 150-159.
92. Petroski, M. D. (2008) The ubiquitin system, disease, and drug discovery, *BMC Biochem* 21, 1471-2091.
93. Mackintosh, C., Ordonez, J. L., Garcia-Dominguez, D. J., Sevillano, V., Llombart-Bosch, A., Szuhai, K., Scotlandi, K., Alberghini, M., Sciot, R., Sinnaeve, F., Hogendoorn, P. C., Picci, P., Knuutila, S., Dirksen, U., Debiec-Rychter, M., Schaefer, K. L., and de Alava, E. (2012) 1q gain and CDT2 overexpression underlie an aggressive and highly proliferative form of Ewing sarcoma, *Oncogene* 31, 1287-1298.
94. Przybyl, J., Kozak, K., Kosela, H., Falkowski, S., Switaj, T., Lugowska, I., Szumera-Cieckiewicz, A., Ptaszynski, K., Grygalewicz, B., Chechlinska, M., Pienkowska-Grela, B., Debiec-Rychter, M., Siedlecki, J. A., and Rutkowski, P. (2014) Gene expression profiling of peripheral blood cells: new insights into Ewing sarcoma biology and clinical applications, *Med Oncol* 31, 109.
95. Pan, W. W., Zhou, J. J., Yu, C., Xu, Y., Guo, L. J., Zhang, H. Y., Zhou, D., Song, F. Z., and Fan, H. Y. (2013) Ubiquitin E3 ligase CRL4(CDT2/DCAF2) as a potential chemotherapeutic target for ovarian surface epithelial cancer, *J Biol Chem* 288, 29680-29691.
96. Benamar, M., Guessous, F., Du, K., Corbett, P., Obeid, J., Gioeli, D., Slingluff, C. L., Jr., and Abbas, T. (2016) Inactivation of the CRL4-CDT2-SET8/p21 ubiquitylation and degradation axis underlies the therapeutic efficacy of pevonedistat in melanoma, *EBioMedicine* 10, 85-100.
97. Vanderdys, V., Allak, A., Guessous, F., Benamar, M., Read, P. W., Jameson, M. J., and Abbas, T. (2017) The Neddylation Inhibitor Pevonedistat (MLN4924) Suppresses and Radiosensitizes Head and Neck Squamous Carcinoma Cells and Tumors, *Molecular cancer therapeutics*.
98. Du, J., Johnson, L. M., Jacobsen, S. E., and Patel, D. J. (2015) DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation, *Nature reviews. Molecular cell biology* 16, 519-532.

99. Tachibana, M., Ueda, J., Fukuda, M., Takeda, N., Ohta, T., Iwanari, H., Sakihama, T., Kodama, T., Hamakubo, T., and Shinkai, Y. (2005) Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9, *Genes Dev* 19, 815-826.
100. Smallwood, A., Esteve, P. O., Pradhan, S., and Carey, M. (2007) Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing, *Genes Dev* 21, 1169-1178.
101. Chin, H. G., Esteve, P. O., Pradhan, M., Benner, J., Patnaik, D., Carey, M. F., and Pradhan, S. (2007) Automethylation of G9a and its implication in wider substrate specificity and HP1 binding, *Nucleic acids research* 35, 7313-7323.
102. Sampath, S. C., Marazzi, I., Yap, K. L., Sampath, S. C., Krutchinsky, A. N., Mecklenbräuker, I., Viale, A., Rudensky, E., Zhou, M.-M., Chait, B. T., and Tarakhovsky, A. (2007) Methylation of a Histone Mimic within the Histone Methyltransferase G9a Regulates Protein Complex Assembly, *Mol Cell* 27, 596-608.
103. Shinkai, Y., and Tachibana, M. (2011) H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule GLP, *Genes Dev* 25, 781-788.
104. Collins, R. E., Northrop, J. P., Horton, J. R., Lee, D. Y., Zhang, X., Stallcup, M. R., and Cheng, X. (2008) The ankyrin repeats of G9a and GLP histone methyltransferases are mono- and dimethyllysine binding modules, *Nat Struct Mol Biol* 15, 245-250.
105. Tachibana, M., Matsumura, Y., Fukuda, M., Kimura, H., and Shinkai, Y. (2008) G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription, *EMBO J* 27, 2681-2690.
106. Bian, C., Chen, Q., and Yu, X. (2015) The zinc finger proteins ZNF644 and WIZ regulate the G9a/GLP complex for gene repression, *Elife*.
107. Dungrawala, H., Rose, K. L., Bhat, K. P., Mohni, K. N., Glick, G. G., Couch, F. B., and Cortez, D. (2015) The Replication Checkpoint Prevents Two Types of Fork Collapse without Regulating Replisome Stability, *Mol Cell* 59, 998-1010.
108. Giri, S., Aggarwal, V., Pontis, J., Shen, Z., Chakraborty, A., Khan, A., Mizzen, C., Prasanth, K. V., Ait-Si-Ali, S., Ha, T., and Prasanth, S. G. (2015) The preRC protein ORCA organizes heterochromatin by assembling histone H3 lysine 9 methyltransferases on chromatin, *Elife* 29, 06496.
109. Casciello, F., Windloch, K., Gannon, F., and Lee, J. S. (2015) Functional Role of G9a Histone Methyltransferase in Cancer, *Front Immunol* 6.
110. Yang, Q., Zhu, Q., Lu, X., Du, Y., Cao, L., Shen, C., Hou, T., Li, M., Li, Z., Liu, C., Wu, D., Xu, X., Wang, L., Wang, H., Zhao, Y., Yang, Y., and Zhu, W. G. (2017) G9a coordinates with the RPA complex to promote DNA damage repair and cell survival, *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E6054-E6063.
111. Kang, J., Shin, S. H., Yoon, H., Huh, J., Shin, H. W., Chun, Y. S., and Park, J. W. (2017) FIH is an oxygen sensor in ovarian cancer for G9a/GLP-driven epigenetic regulation of metastasis-related genes, *Cancer Res*.

112. Casciello, F., Al-Ejeh, F., Kelly, G., Brennan, D. J., Ngiew, S. F., Young, A., Stoll, T., Windloch, K., Hill, M. M., Smyth, M. J., Gannon, F., and Lee, J. S. (2017) G9a drives hypoxia-mediated gene repression for breast cancer cell survival and tumorigenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 7077-7082.
113. Liu, X. R., Zhou, L. H., Hu, J. X., Liu, L. M., Wan, H. P., and Zhang, X. Q. (2018) UNC0638, a G9a inhibitor, suppresses epithelial-mesenchymal transition-mediated cellular migration and invasion in triple negative breast cancer, *Molecular medicine reports* 17, 2239-2244.
114. Agarwal, P., and Jackson, S. P. (2016) G9a inhibition potentiates the anti-tumour activity of DNA double-strand break inducing agents by impairing DNA repair independent of p53 status, *Cancer letters* 380, 467-475.
115. Chen, M. W., Hua, K. T., Kao, H. J., Chi, C. C., Wei, L. H., Johansson, G., Shiah, S. G., Chen, P. S., Jeng, Y. M., Cheng, T. Y., Lai, T. C., Chang, J. S., Jan, Y. H., Chien, M. H., Yang, C. J., Huang, M. S., Hsiao, M., and Kuo, M. L. (2010) H3K9 histone methyltransferase G9a promotes lung cancer invasion and metastasis by silencing the cell adhesion molecule Ep-CAM, *Cancer Res* 70.
116. Dong, C., Wu, Y., Yao, J., Wang, Y., Yu, Y., Rychahou, P. G., Evers, B. M., and Zhou, B. P. (2012) G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer, *J Clin Invest* 122.
117. Zhong, X., Chen, X., Guan, X., Zhang, H., Ma, Y., Zhang, S., Wang, E., Zhang, L., and Han, Y. (2015) Overexpression of G9a and MCM7 in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with poor prognosis, *Histopathology* 66, 192-200.
118. Cha, S. T., Tan, C. T., Chang, C. C., Chu, C. Y., Lee, W. J., Lin, B. Z., Lin, M. T., and Kuo, M. L. (2016) G9a/RelB regulates self-renewal and function of colon-cancer-initiating cells by silencing Let-7b and activating the K-RAS/beta-catenin pathway, *Nat Cell Biol* 18, 993-1005.
119. Luo, C.-W., Wang, J.-Y., Hung, W.-C., Peng, G., Tsai, Y.-L., Chang, T.-M., Chai, C.-Y., Lin, C.-H., and Pan, M.-R. (2017) G9a governs colon cancer stem cell phenotype and chemoradioresistance through PP2A-RPA axis-mediated DNA damage response, *Radiotherapy and Oncology* 124, 395-402.
120. Zhang, J., He, P., Xi, Y., Geng, M., Chen, Y., and Ding, J. (2015) Down-regulation of G9a triggers DNA damage response and inhibits colorectal cancer cells proliferation, *Oncotarget* 6, 2917-2917.
121. Ciccia, A., and Elledge, S. J. (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives, *Mol Cell* 40, 179-204.
122. Brandsma, I., and van Gent, D. C. (2012) Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act, *Genome Integrity* 3, 9.
123. Lieber, M. R. (2010) The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway, *Annu Rev Biochem* 79, 181-211.
124. Limbo, O., Chahwan, C., Yamada, Y., de Bruin, R. A., Wittenberg, C., and Russell, P. (2007) Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination, *Mol Cell* 28, 134-146.

125. Pardo, B., Gomez-Gonzalez, B., and Aguilera, A. (2009) DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship, *Cell Mol Life Sci* 66, 1039-1056.
126. Heyer, W. D., Ehmsen, K. T., and Liu, J. (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes, *Annu Rev Genet* 44, 113-139.
127. Mendez, J., and Stillman, B. (2000) Chromatin Association of Human Origin Recognition Complex, Cdc6, and Minichromosome Maintenance Proteins during the Cell Cycle: Assembly of Prereplication Complexes in Late Mitosis, *Molecular and cellular biology* 20, 8602–8612.
128. Cardozo, T., and Pagano, M. (2007) Wrenches in the works: drug discovery targeting the SCF ubiquitin ligase and APC/C complexes, *BMC Biochem* 22, 1471-2091.
129. Olivero, M., Dettori, D., Arena, S., Zecchin, D., Lantelme, E., and Di Renzo, M. (2014) The stress phenotype makes cancer cells addicted to CDT2, a substrate receptor of the CRL4 ubiquitin ligase, *Oncotarget* 5, 5992-6002.
130. Dellaire, G., Makarov, E. M., Cowger, J. M., Longman, D., Sutherland, H. G. E., Luhrmann, R., Torchia, J., and Bickmore, W. A. (2002) Mammalian PRP4 Kinase Copurifies and Interacts with Components of Both the U5 snRNP and the N-CoR Deacetylase Complexes, *Molecular and cellular biology* 22, 5141-5156.
131. Schwartz, S., Mumbach, M. R., Jovanovic, M., Wang, T., Maciag, K., Bushkin, G. G., Mertins, P., Ter-Ovanesyan, D., Habib, N., Cacchiarelli, D., Sanjana, N. E., Freinkman, E., Pacold, M. E., Satija, R., Mikkelsen, T. S., Hacohen, N., Zhang, F., Carr, S. A., Lander, E. S., and Regev, A. (2014) Perturbation of m6A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites, *Cell reports* 8, 284-296.
132. Nayler, O., Strätling, W., Bourquin, J.-P., Stagljar, I., Lindemann, L., Jasper, H., Hartmann, A. M., Fackelmayer, F. O., Ullrich, A., and Stamm, S. (1998) SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements, *Nucleic acids research* 26, 3542-3549.
133. Henras, A., Henry, Y., Bousquet - Antonelli, C., Noaillac - Depeyre, J., Gélugne, J. P., and Caizergues - Ferrer, M. (1998) Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs, *EMBO J* 17, 7078-7090.
134. Lau, C. K., Bachorik, J. L., and Dreyfuss, G. (2009) Gemin5-snRNA interaction reveals an RNA binding function for WD repeat domains, *Nat Struct Mol Biol* 16, 486-491.
135. Shankar, S. R., Bahirvani, A. G., Rao, V. K., Bharathy, N., Ow, J. R., and Taneja, R. (2013) G9a, a multipotent regulator of gene expression, *Epigenetics* 8, 16-22.
136. Takahashi, A., Imai, Y., Yamakoshi, K., Kuninaka, S., Ohtani, N., Yoshimoto, S., Hori, S., Tachibana, M., Anderton, E., Takeuchi, T., Shinkai, Y., Peters, G., Saya, H., and Hara, E. (2012) DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C(Cdh1) in senescent cells, *Mol Cell* 45, 123-131.
137. Arias, E. E., and Walter, J. C. (2006) PCNA functions as a molecular platform to trigger Cdt1 destruction and prevent re-replication, *Nat Cell Biol* 8, 84-90.
138. Havens, C. G., and Walter, J. C. (2011) Mechanism of CRL4(Cdt2), a PCNA-dependent E3 ubiquitin ligase, *Genes Dev* 25, 1568-1582.

139. Yoshida, Y., Saeki, Y., Murakami, A., Kawawaki, J., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Shindo, M., and Tanaka, K. (2015) A comprehensive method for detecting ubiquitinated substrates using TR-TUBE, *PNAS* 112, 4630-4635.
140. Hjerpe, R., Aillet, F., Lopitz-Otsoa, F., Lang, V., England, P., and Rodriguez, M. S. (2009) Efficient protection and isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities, *EMBO reports* 10, 1250-1258.
141. Ueda, J., Tachibana, M., Ikura, T., and Shinkai, Y. (2006) Zinc finger protein Wiz links G9a/GLP histone methyltransferases to the co-repressor molecule CtBP, *J Biol Chem* 281, 20120-20128.
142. Fiszbain, A., Giono, L. E., Quaglino, A., Berardino, B. G., Sigaut, L., von Bilderling, C., Schor, I. E., Steinberg, J. H., Rossi, M., Pietrasanta, L. I., Caramelo, J. J., Srebrow, A., and Kornblihtt, A. R. (2016) Alternative Splicing of G9a Regulates Neuronal Differentiation, *Cell reports* 14, 2797-2808.
143. Rathert, P., Dhayalan, A., Murakami, M., Zhang, X., Tamas, R., Jurkowska, R., Komatsu, Y., Shinkai, Y., Cheng, X., and Jeltsch, A. (2008) Protein lysine methyltransferase G9a acts on non-histone targets, *Nature chemical biology* 4, 344-346.
144. Bassermann, F., Eichner, R., and Pagano, M. (2014) The ubiquitin proteasome system - implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer, *Biochim Biophys Acta* 1843, 150-162.
145. Sang, Y., Yan, F., and Ren, X. (2015) The role and mechanism of CRL4 E3 ubiquitin ligase in cancer and its potential therapy implications, *Oncotarget* 6, 42590-42602.
146. Kobayashi, H., Komatsu, S., Ichikawa, D., Kawaguchi, T., Hirajima, S., Miyamae, M., Okajima, W., Ohashi, T., Kosuga, T., Konishi, H., Shiozaki, A., Fujiwara, H., Okamoto, K., Tsuda, H., and Otsuji, E. (2015) Overexpression of denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog (DTL) is related to poor outcome in gastric carcinoma, *Oncotarget* 6 36615-36624.
147. Barr, A. R., Cooper, S., Heldt, F. S., Butera, F., Stoy, H., Mansfeld, J., Novak, B., and Bakal, C. (2017) DNA damage during S-phase mediates the proliferation-quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression, *Nature communications* 8, 14728.
148. Tanaka, M., Takahara, M., Nukina, K., Hayashi, A., Sakai, W., Sugawara, K., Shiomi, Y., and Nishitani, H. (2017) Mismatch repair proteins recruited to ultraviolet light-damaged sites lead to degradation of licensing factor Cdt1 in the G1 phase, *Cell Cycle* 16, 673-684.
149. Estève, P.-O., Patnaik, D., Chin, H. G., Benner, J., Teitell, M. A., and Pradhan, S. (2005) Functional analysis of the N- and C-terminus of mammalian G9a histone H3 methyltransferase, *Nucleic acids research* 33, 3211-3223.
150. Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H., Kato, H., and Shinkai, Y. (2002) G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis, *Genes Dev* 16.
151. Liu, N., Zhang, Z., Wu, H., Jiang, Y., Meng, L., Xiong, J., Zhao, Z., Zhou, X., Li, J., Li, H., Zheng, Y., Chen, S., Cai, T., Gao, S., and Zhu, B. (2015) Recognition of H3K9 methylation by GLP is

- required for efficient establishment of H3K9 methylation, rapid target gene repression, and mouse viability, *Genes Dev* 29, 379-393.
152. Chen, M. W., Hua, K. T., Kao, H. J., Chi, C. C., Wei, L. H., Johansson, G., Shiah, S. G., Chen, P. S., Jeng, Y. M., Cheng, T. Y., Lai, T. C., Chang, J. S., Jan, Y. H., Chien, M. H., Yang, C. J., Huang, M. S., Hsiao, M., and Kuo, M. L. (2010) H3K9 histone methyltransferase G9a promotes lung cancer invasion and metastasis by silencing the cell adhesion molecule Ep-CAM, *Cancer research* 70, 7830-7840.
 153. Tao, H., Li, H., Su, Y., Feng, D., Wang, X., Zhang, C., Ma, H., and Hu, Q. (2014) Histone methyltransferase G9a and H3K9 dimethylation inhibit the self-renewal of glioma cancer stem cells, *Molecular and cellular biochemistry* 394, 23-30.
 154. Dong, C., Wu, Y., Yao, J., Wang, Y., Yu, Y., Rychahou, P. G., Evers, B. M., and Zhou, B. P. (2012) G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer, *The Journal of Clinical Investigation* 122, 1469-1486.
 155. Hua, K.-T., Wang, M.-Y., Chen, M.-W., Wei, L.-H., Chen, C.-K., Ko, C.-H., Jeng, Y.-M., Sung, P.-L., Jan, Y.-H., Hsiao, M., Kuo, M.-L., and Yen, M.-L. (2014) The H3K9 methyltransferase G9a is a marker of aggressive ovarian cancer that promotes peritoneal metastasis, *Molecular Cancer* 13, 189.
 156. Lehnertz, B., Pabst, C., Su, L., Miller, M., Liu, F., Yi, L., Zhang, R., Krosch, J., Yung, E., Kirschner, J., Rosten, P., Underhill, T. M., Jin, J., Hébert, J., Sauvageau, G., Humphries, R. K., and Rossi, F. M. (2014) The methyltransferase G9a regulates HoxA9-dependent transcription in AML, *Genes Dev* 28.
 157. Kim, K., Son, M. Y., Jung, C. R., Kim, D. S., and Cho, H. S. (2018) EHMT2 is a metastasis regulator in breast cancer, *Biochemical and biophysical research communications*.
 158. Ding, J., Li, T., Wang, X., Zhao, E., Choi, J. H., Yang, L., Zha, Y., Dong, Z., Huang, S., Asara, J. M., Cui, H., and Ding, H. F. (2013) The histone H3 methyltransferase G9A epigenetically activates the serine-glycine synthesis pathway to sustain cancer cell survival and proliferation, *Cell Metab* 18.
 159. Savickiene, J., Treigyte, G., Stirblyte, I., Valiulienė, G., and Navakasienė, R. (2014) Euchromatic histone methyltransferase 2 inhibitor, BIX-01294, sensitizes human promyelocytic leukemia HL-60 and NB4 cells to growth inhibition and differentiation, *Leukemia Research* 38, 822-829.
 160. Sampath, S. C., Marazzi, I., Yap, K. L., Krutchinsky, A. N., Mecklenbrauker, I., Viale, A., Rudensky, E., Zhou, M. M., Chait, B. T., and Tarakhovsky, A. (2007) Methylation of a histone mimic within the histone methyltransferase G9a regulates protein complex assembly, *Mol Cell* 27, 596-608.
 161. Poulard, C., Bittencourt, D., Wu, D. Y., Hu, Y., Gerke, D. S., and Stallcup, M. R. (2017) A post-translational modification switch controls coactivator function of histone methyltransferases G9a and GLP, *EMBO reports* 18, 1442-1459.
 162. Lee, J. S., Kim, Y., Kim, I. S., Kim, B., Choi, H. J., Lee, J. M., Shin, H.-J. R., Kim, J. H., Kim, J.-Y., Seo, S.-B., Lee, H., Binda, O., Gozani, O., Semenza, G. L., Kim, M., Kim, K. I., Hwang, D., and Baek, S. H. (2010) Negative Regulation of Hypoxic Responses via Induced Reptin Methylation, *Mol Cell* 39, 71-85.

163. Lee, J. S., Kim, Y., Bhin, J., Shin, H.-J. R., Nam, H. J., Lee, S. H., Yoon, J.-B., Binda, O., Gozani, O., Hwang, D., and Baek, S. H. (2011) Hypoxia-induced methylation of a pontin chromatin remodeling factor, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 13510-13515.
164. Huang, J., Dorsey, J., Chuikov, S., Perez-Burgos, L., Zhang, X., Jenuwein, T., Reinberg, D., and Berger, S. L. (2010) G9a and Glp methylate lysine 373 in the tumor suppressor p53, *J Biol Chem* 285, 9636-9641.
165. Ferry, L., Fournier, A., Tsusaka, T., Adelmant, G., Shimazu, T., Matano, S., Kirsh, O., Amouroux, R., Dohmae, N., Suzuki, T., Fillion, G. J., Deng, W., de Dieuleveult, M., Fritsch, L., Kudithipudi, S., Jeltsch, A., Leonhardt, H., Hajkova, P., Marto, J. A., Arita, K., Shinkai, Y., and Defossez, P. A. (2017) Methylation of DNA Ligase 1 by G9a/GLP Recruits UHRF1 to Replicating DNA and Regulates DNA Methylation, *Mol Cell* 67, 550-565 e555.
166. Tian, Y., Paramasivam, M., Ghosal, G., Chen, D., Shen, X., Huang, Y., Akhter, S., Legerski, R., Chen, J., Seidman, M. M., Qin, J., and Li, L. (2015) UHRF1 contributes to DNA damage repair as a lesion recognition factor and nuclease scaffold, *Cell reports* 10, 1957-1966.
167. Zhang, H., Liu, H., Chen, Y., Yang, X., Wang, P., Liu, T., Deng, M., Qin, B., Correia, C., Lee, S., Kim, J., Sparks, M., Nair, A. A., Evans, D. L., Kalari, K. R., Zhang, P., Wang, L., You, Z., Kaufmann, S. H., Lou, Z., and Pei, H. (2016) A cell cycle-dependent BRCA1-UHRF1 cascade regulates DNA double-strand break repair pathway choice, *Nature communications* 7, 10201.
168. Ginja, V., Rodriguez-Colon, L., Ganguly, B., Gangidi, P., Gallina, P., Al-Hraishawi, H., Kulkarni, A., Tang, J., Gheeya, J., Simhadri, S., Yao, M., Xia, B., and Ganesan, S. (2017) Protein-lysine methyltransferases G9a and GLP1 promote responses to DNA damage, *Scientific reports* 7, 16613.
169. Gursoy-Yuzugullu, O., Carman, C., Serafim, R. B., Myronakis, M., Valente, V., and Price, B. D. (2017) Epigenetic therapy with inhibitors of histone methylation suppresses DNA damage signaling and increases glioma cell radiosensitivity, *Oncotarget* 8, 24518-24532.
170. Rao, V. K., Ow, J. R., Shankar, S. R., Bharathy, N., Manikandan, J., Wang, Y., and Taneja, R. (2016) G9a promotes proliferation and inhibits cell cycle exit during myogenic differentiation, *Nucleic acids research* 44, 8129-8143.
171. Ling, B. M., Bharathy, N., Chung, T. K., Kok, W. K., Li, S., Tan, Y. H., Rao, V. K., Gopinadhan, S., Sartorelli, V., Walsh, M. J., and Taneja, R. (2012) Lysine methyltransferase G9a methylates the transcription factor MyoD and regulates skeletal muscle differentiation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 841-846.

ANEXO

Lista de genes interactores de Cdt2 purificados por espectrometría de masa en tandem (MS/MS)

Gene	CDT2- MG- Sol1	CDT2- MG- Sol2	CDT2- MG- Sol3	CDT2- MG- MLN- Sol1	CDT2- MG- MLN- Sol2	CDT2- MG- MLN- Sol3	CDT2- MG- UV- Sol2	CDT2- MG- MLN- UV- Sol2	CDT2- MG- MLN- HU- Sol3	CDT2- MG- MLN- CPT- Sol4	CDT2- MG- MLN- Chr1	CDT2- MG- MLN- Chr2	CDT2- MG- MLN- Chr3	CDT2- MG- Chr2	CDT2- MG- Chr3	CDT2- MG- UV- Chr2	CDT2- MG- MLN- UV- Chr2	CDT2- MG- MLN- HU- Chr3	CDT2- MG- CPT- Chr4
PRPF4B									4		2	2	6	13	15	4	7		3
KIAA1429									5			2	3	7	12	8	6		1
C9orf41	9	7	10	16	17	21	6	6	4	83			4	5	4	5	4	13	2
SAFB					1				2		3	3	5	8		4	3		7
RPL21		2	1	6	5	6	4			6				3	3	5	2	5	
NHP2														4	2	4	4		3
EHMT1									1			1	5	5	2	2	1		
WIZ									1		2	1	2	1	7			1	1
ZNF644											6				4	2	1		
SENP3					2						2	2	3		4				
ZC3H13													2	2	3	3			
MAGOH													2	4	1				3
USP42									2				2		7				
KDM5B													2		7				

EHMT2														
MDC1	1			1	2	1	1			3	3	1		
UQCRH		2	2		1		3	2		1			2	
NUP37											6			1
KIAA1671							4	1	1				1	
YY1AP1									2	2	3			
KIFC1									2		5			
PRPF3					1				1	2	2	1		
WDR3		2					4		1		1			
RAD54L2											6			
ZBTB39									2		4			
MCM2	3			3	4	1	4		1					
KDM2B					1		3				2			
RFWD3			1							3	2			
NUP98			1				1				3		1	
TEX10			3				1			1	3			
SIN3B											3	1		1
TRIM24										1	3	1		
WDR46							3	2						
CDC40											4			1

ZBTB9									5				
CBX8								1	1	2		1	
RAD51C								1	2				2
DAXX						2	1			3			
SCAF1						1				4			
AAMP	1	1	2	2	2			3		3		1	
TNNT3							1	1	3				
RGPD6										4			
KDM5A								1		3			
GPATCH8									2	1	1		
DHX57									2	2			
NOL10							1			3			
ZNF131									1	2	1		
TCF7L2									2	2			
DMAP1							2				2		
BRMS1L										3			1
SLC9A3R2								1		3			
MSX1										4			
SMNDC1									2			2	
SUMO1									3	1			

PRDM10					1		1		2				
MAPK13		1		1								3	
RNF187	1		1						3				
CHD7									3				
BAZ1A									2	1			
POGZ							2		1				
DHX8								1		2			
MORC4									2				
RBM25							2		1				
DUS3L							2	1					
TFCP2										3			
ETV3							3						
ZIC2									1	2			
SNX5										3			
CBX6									2		1		
WDR74										1			2
MKI67IP							3						
MTAP								3					
MSX2										2		1	
GATAD1									1	1	1		

IMP3									1	1		1		
POLE3							1			2				
NDUFA11											2	1		
LSM2									3					
STRN4	3	2		2	2		1						2	
SLC25A1	1		5		1							2		
CAMSAP1L1					1	1		1			1		1	
RNF114					2			2						
SRPK1		1						1		1				
NT5C					1					2				
ARID2									2					
BCORL1										2				
RREB1								1		1				
PHRF1										1			1	
ASXL1										2				
MED14							1				1			
SNAPC4										2				
TOPORS										2				
ZZZ3										2				
SRRT							1			1				

MPHOSPH8								2				
UHRF1							2					
PPIG												2
BARD1							2					
GNL2								2				
FAF1								2				
NOLC1									1	1		
LRIT1											2	
NEIL3									2			
CENPB							2					
BBS1								2				
ZGPAT							2					
WT1								2				
FBRS									1			
RUNX3									2			
HMG20A								2				
CCDC109A									1	1		
TRIM44										2		
ERCC1								2				
HOXA11							2					

GTF2H3							1	1				
CCDC137								2				
NSMCE2								2				
SNRPB2											2	
HOXB6							2					
NFYB							2					
CBX5											2	
MRFAP1							2					
KCNG4			1			1	1	1				
MECOM						1			1			
DDX52						1		1				
FAM60A						1	1					
IER2						1	1					
PANK4	2	3		4			2				1	
COX15	4			1	1	2		1				
FBXL12				4	4				1			
HSPB8	2	2			2						1	
OSTC			1	2	1		1				1	
TRPC4AP				1	2						1	
CBWD2	1			2								1

EXOSC4							3			1			
URB1				1	1					1			
UGGT2				2								1	
SMYD4				2						1			
GALNT9						1	1		1				
RUNDC1					1	1					1		
STARD7					2					1			
DOHH				2						1			
POLA1			1							1			
ZRANB1						1			1				
METTL3				1							1		
C20orf7	1									1			
RPL7L1				1						1			
C12orf45					1					1			
NDUFB11												1	
ZNF398					0					1			
FOXS1										0		1	
RBBP6								2					
ESRP2								2					
TMEM49	2	1	2	1	4	3	2	2					

[illegible]

[illegible]

TSSC1		2										
PCYT1A			2									
FOXQ1		1		1								
LIMS2			1		1							
AMD1					2							
SLC25A19				2								
SLC25A17		2										
MCART6	1						1					
C18orf19		2										
BHLHE23	1		1									
MRPS23				2								
BNIP3	2											
TMEM126A		2										
TRAPPC1	2											
MRPS6				2								
KRTAP2-1				1			1					
MYEOV2					2							
STRN3	0				0							

Primers utilizados para realizar la mutagénesis en el vector de G9a

G9A_477*_F CATCCAGCCGTGTGGCCTAGTAGGTGCTCTGTGAGACCC
G9A_477*_R GGGTCTCACAGAGCACCTACTAGGCCACACGGCTGGATG
G9A_529*_F GGCCTGTGTGTCTCAGCTGAATTAGTAGGTCTTCTGTCCCCACT
G9A_529*_R AGTGGGGACAGAAGACCTACTAATTCAGCTGAGACACACAGGCC
G9A_581*_F GGGAGAGCAGACACTTCTCAGTAGTAGGCCCCGGATGCGAGGGCATGGG
G9A_581*_R CCCATGCCCTCGCATCCGGGCCTACTACTGAGAAGTGTCTGCTCTCCC
G9A_633*_F CCGGGAGGGCCCTGTAATAGGCCCTGGTCAT
G9A_633*_R ATGACCAGGGCCTATTACAGGGCCTCCCGG
G9A_1112NH-LE_F TGGCAACATCAGCCGCTTCATCTTAGAGCTGTGTGACCCCAACATCATT
G9A_1112NH-LE_R GAATGATGTTGGGGTCACACAGCTCTAAGATGAAGCGGCTGATGTTGCCA
C1115A_F GGAATGATGTTGGGGTCAGCCAGGTGGTTGATGAAGCG
C1115A_R CGCTTCATCAACCACCTGGCTGACCCCAACATCATTCC
G9A_922_*TCATAGCCCCGAGCCACCTACTACTAGATGATCTTCTCTGTGCGGATGGCC
G9A_922_*GGCCATCCGCACAGAGAAGATCATCTAGTAGTAGGTGGCTCGGGGCTATGA
G9A_494*_F GTAGCCGCAGCCCTACTAGCAGTGGTGTGTTGACCATGCGGG
G9A_494*_R CCCGCATGGTCAAACACCACTGCTAGTAGGGCTGCGGCTAC
G9A_510*_F GGTGGGCCACACGGAAGTCCTACTAGCACTCCAGGAAGGTGCCC
G9A_510*_R GGGCACCTTCCTGGAGTGCTAGTAGGACTTCCGTGTGGCCCACC
G9A_C533_536A_F AGAAGCATCCTCCCCAGCGTGGGGAGCGAAGACCATCCCATTC
G9A_C533_536A_R GAATGGGATGGTCTTCGCTCCCCACGCTGGGGAGGATGCTTCT
G9A_C533_6A_H35A_F
CTTCAGAAGCATCCTCCCCAGCGGCGGGAGCGAAGACCATCCCATTCAGCT
G9A_C533_6A_H35A_R
AGCTGAATGGGATGGTCTTCGCTCCCGCCGCTGGGGAGGATGCTTCTGAAG
G9A_K185A_F GGTTTGGACATGGTTGCGCGGGCTCGGTGGAC
G9A_K185A_R GTCCACCGAGCCCGCGCAACCATGTCCAAACC
G9A_T186D_F CCTGGTTTGGACATGTCTTTGCGGGCTCGGTGG
G9A_T186D_R CCACCGAGCCCGCAAAGACATGTCCAAACCAGG
G9A_T186E_F ATTTCTGGTTTGGACATCTCTTTGCGGGCTCGGTGGACC
G9A_T186E_R GGTCCACCGAGCCCGCAAAGAGATGTCCAAACCAGGAAAT
G9A_650*_F ACGGACAGGTACAACGCGCTACTAGAAACGGAGCTTCTCCGCC
G9A_650*_R GCGGAAGAAGCTCCGTTTCTAGTAGCGGCAGTTGTACCTGTCCGT
G9A_666*_F GGTTGTCCAACAGCATCAGCTACTACTTCTGCAGCTCGCCCTGC
G9A_666*_R GCAGGGCGAGCTGCAGAAGTAGTAGCTGATGCTGTTGGACAACC
G9A_D1112_1115_F CATCAGCCGCTTCATCGACCCCAACATCATT
G9A_D1112_1115_R GAATGATGTTGGGGTCGATGAAGCGGCTGATG
G9A_481*_F GTGTGGCCCTGATGGTGTCTAGTAGACCCACCGC
G9A_481*_R GCGGTGGGTCTACTAGAGCACCATCAGGGCCACAC

G9A_485*_FGATGGTGCTCTGTGAGACCCACTAGTAGCGCATGGTCAAACACCACTGCT
G9A_485*_R AGCAGTGGTGTGTTGACCATGCGCTACTAGTGGGTCTCACAGAGCACCATC
G9A_489*_FCCACCGCGCCCGCATGTAGTAACACCACTGCTGCCC
G9A_489*_R GGGCAGCAGTGGTGTACTACATGCGGGCGCGGTGG
G9A_546*_FTGCTTCTGAAGCTCAAGAGTAGTAGATCCCCGGGGTGACGGGG
G9A_546*_R CCCCCTCACCCCGGGGATCTACTACTCTTGAGCTTCAGAAGCA
G9A_563*_FCCCCACCGCCGGCACTGCAGCTTAGTAGCCCCCACCCTG
G9A_563*_R CAGGGGTGGGGGCTACTAAGCTGCAGTGCCGGCCGGTGGGG
G9A_671*_FAGGTGATCCTGATGCTGTAGTAGAACCTGGACCCCAACTTC
G9A_671*_R GAAGTTGGGGTCCAGGTTCTACTACAGCATCAGGATCACCT
G9A_676*_FTGCTGTTGGACAACCTGGACTAGTAGTTCCAGAGCGACCAGCAGAG
G9A_676*_R CTCTGCTGGTCGCTCTGGAACCTAGTCCAGGTTGTCCAACAGCA
G9A_681*_FCCCCAACTTCCAGAGCTAGTAGCAGAGCAAGCGCAC
G9A_681*_R GTGCGCTTGCTCTGCTACTAGCTCTGGAAGTTGGGG
G9A_667_5A_F
GAAGCAGGGCGAGCTGCAGAAGGTGGCCGCGGCGGCGGCGGACAACCTGGACCCCAACTTCCAG
G9A_667_5A_R
CTGGAAGTTGGGGTCCAGGTTGTCCGCCGCCGCCGCCGCCACCTTCTGCAGCTCGCCCTGCTTC
G9A_667_2A_F GGCGAGCTGCAGAAGGTGGCCGCGATGCTGTTGGACAACCT
G9A_667_2A_R AGGTTGTCCAACAGCATCGCGGCCACCTTCTGCAGCTCGCC
G9A_668_2A_F CGAGCTGCAGAAGGTGATCGCGGCGCTGTTGGACAACCTGGAC
G9A_668_2A_R GTCCAGGTTGTCCAACAGCGCCGCGATCACCTTCTGCAGCTCG
G9A_669_2A_F CTGCAGAAGGTGATCCTGGCGGCGTTGGACAACCTGGACCC
G9A_669_2A_R GGGTCCAGGTTGTCCAACGCCGCCAGGATCACCTTCTGCAG
G9A_670_2A_F GCAGAAGGTGATCCTGATGGCGGCGGACAACCTGGACCCCAAC
G9A_670_2A_F GTTGGGGTCCAGGTTGTCCGCCGCCATCAGGATCACCTTCTGC
G9A_7A_F
GGGCAGCAGTGGTGTGTTGACCGCGGCGGCGGCGGCGGCCGAGCGAGCACCATCAGGGCCACACG
G9A_7A_R
CGTGTGGCCCTGATGGTGCTCGCTGCGGCCGCCGCCGCCGCCGCGGTCAAACACCACTGCTGCCC
G9A_481_4_FGACCATGCGGGCGCGGGCGGCCGAGCGAGCACCATCAGGGCC
G9A_481_4_RGGCCCTGATGGTGCTCGCTGCGGCCGCCGCCGCCGCCGCGCATGGTC
G9A_485_9_FCAGCAGTGGTGTGTTGACCGCGGCGGCGGCGGTGGGTCTCACAGAGCAC
G9A_485_9_RGTGCTCTGTGAGACCCACGCCGCCGCCGCCGCGGTCAAACACCACTGCTG

Primers que utilizados para secuenciar los plásmidos de G9a

G9A_1315_F AGCGAGAGGGCGGGGCACAAGTGC
 G9A_1972_R CTTCTGCAGCTCGCCCTGCTTCAC
 G9A_2112_R CAGCACATGGCAGATCTCCAC
 G9A_342_F TCATTCCCCTCTTCCCCC
 G9A_1366_F CTGTCAGGCTGCAATGCCGCC

Primers utilizados para realizar la mutagénesis en el vector de GLP

GLP_1198NH-LE_F AGGTTGGGTTTCGCAGTGCTCTAATATGAACCGGCTGACATTCCCATAGAACC
 GLP_1198NH-LE_R GGTTCATATGGGAATGTCAGCCGGTTCATATTAGAGCACTGCGAACCCAACCT
 GLP_C1201A_F GCACAAGGTTGGGTTTCGGCGTGGTGGTTTATGAACC
 GLP_C1201A_R GGTTCTATAAACCACACGCCGAACCCAACCTTGTGC
 GLP_D1198_1201_F GGAATGTCAGCCGGTTCATAGAACCCAACCTTGTG
 GLP_D1198_1201_R CACAAGGTTGGGTTCTATGAACCGGCTGACATTCC

Primers utilizados para realizar mutagénesis en el vector de Cdt2

CDT2_R246A_F GTGGATGGGATAATCAAAGTATGGGATTTAGCTAAGAATTATACTGCTTAT
 CDT2_R246A_R ATAAGCAGTATAATTCTTAGCTAAATCCCATACTTTGATTATCCCATCCAC

Secuencias guías para generar las líneas *Knockout* por CRISPR/Cas9

Para G9a

Primer exón

Guía #1 AGATGCGGGGTCTACCGAGA GGG

Guía #2 GAGATGCGGGGTCTACCGAG AGG

Guía #3 CTCGGTAGACCCCGCATCTC TGG

Tercer exón

Guía #1 ATGAGTGGTGTAGCCCCTAC AGG

Guía #2 GCAGGGTTTCTTCACTACGA GGG

Guía #3 GGCAGGGTTTCTTCACTACG AGG

Para GLP

Guía #1 CAACACACTAACTCGGATAG CGG

Guía #2 CTAACCTCGGATAGCGGAAAA TGG

Guía # 3 CGCTATCCGAGTTAGTGTGT TGG

Primers

CRISP_G9a_1_1F CACCGAGATGCGGGGTCTACCGAGA

CRISP_G9a_1_1R AAACCTCTCGGTAGACCCCGCATCTC

CRISP_G9a_1_2F CACCGGAGATGCGGGGTCTACCGAG

CRISP_G9a_1_2R AAACCTCGGTAGACCCCGCATCTCC

CRISP_G9a_1_3F CACCGCTCGGTAGACCCCGCATCTC

CRISP_G9a_1_3R AAACGAGATGCGGGGTCTACCGAGC

CRISP_G9a_3_1F CACCGATGAGTGGTGTAGCCCCTAC

CRISP_G9a_3_1R AAACGTAGGGGCTACACCACTCATC

CRISP_G9a_3_2F CACCGGCAGGGTTTCTTCACTACGA

CRISP_G9a_3_2R AAACCTCGTAGTGAAGAAACCCTGCC

CRISP_G9a_3_3F CACCGGCAGGGTTTCTTCACTACG

CRISP_G9a_3_3R AAACCGTAGTGAAGAAACCCTGCCC

CRISP_GLP_1F CACCGCAACACACTAACTCGGATAG

CRISP_GLP_1R AAACCTATCCGAGTTAGTGTGTTGC

CRISP_GLP_2F CACCGCTAACTCGGATAGCGGAAAA

CRISP_GLP_2R AAACCTTTTCCGCTATCCGAGTTAGC

CRISP_GLP_3F CACCGCGCTATCCGAGTTAGTGTGT

CRISP_GLP_3R AAACACACACTAACTCGGATAGCGC